

**Entwicklung siRNA basierter Therapieansätze im Mausmodell am Beispiel  
viraler Hepatitiden**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Catherine Isabell Real

aus Oberhausen

März 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Essen, eine Einrichtung der Universität Duisburg-Essen, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Jörg F. Schlaak durchgeführt.

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Jörg F. Schlaak

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Hemmo Meyer

**3. Gutachter:** Prof. Dr. Mengji Lu

**Vorsitzender des Prüfungsausschusses:** Prof. Dr. Ralf Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 05.09.2014

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Die Leber .....	1
1.2	Hepatitiden .....	5
1.2.1	Das Hepatitis-C-Virus (HCV) .....	5
1.2.2	Das Hepatitis-B-Virus (HBV) .....	10
1.3	Das angeborene Immunsystem .....	13
1.3.1	Mustererkennende Rezeptoren .....	13
1.3.2	Interferone .....	16
1.3.3	Interferon sensitive Gene (ISGs) .....	17
1.3.3.1	Das Interferon sensitive Gen 15 (ISG15) und seine Rolle in der HCV-Infektion .....	18
1.4	RNA-Interferenz (RNAi) .....	21
1.4.1	RNAi ist ein hoch konservierter eukaryotischer Mechanismus .....	21
1.4.2	Therapeutischer Einsatz von siRNA .....	22
1.5	Zielsetzung .....	25
2	Material und Methoden .....	27
2.1	Material .....	27
2.1.1	Geräte .....	27
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.3	Chemikalien .....	29
2.1.4	Medien und Puffer .....	30
2.1.5	Kits .....	31
2.1.6	Antikörper & Enzyme .....	32
2.1.7	siRNAs .....	33
2.1.8	Oligonukleotide .....	34
2.1.9	Plasmide .....	35
2.1.10	Proteingrößenstandards .....	35
2.1.11	Zytokine & TLR-Liganden .....	36

2.1.12	Versuchstiere .....	36
2.1.13	Hepatomzelllinien .....	37
2.1.14	Software .....	37
2.2	Methoden .....	38
2.2.1	Kultivierung von Zelllinien .....	38
2.2.2	Isolation primärer muriner Hepatozyten (PMH) .....	38
2.2.3	Isolation eines NPC Mix aus dem Hepatozyten Überstand .....	39
2.2.4	Isolation von Kupffer Zellen (KC) oder sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) .....	39
2.2.5	<i>In vitro</i> Stimulation .....	42
2.2.5.1	Verwendung von siRNAs <i>in vitro</i> .....	42
2.2.5.2	ISG15 <i>Knockdown</i> kombiniert mit einem Protease-Inhibitor in HCV-Replikon Zellen .....	43
2.2.5.3	Stimulation von PMH mit Interferonen .....	44
2.2.5.4	Überexpression von Isg15 in HCV-Replikon Zellen .....	44
2.2.6	<i>In vivo</i> Applikationen .....	44
2.2.6.1	Applikation der LNP01 formulierten siRNA <i>in vivo</i> .....	44
2.2.6.2	Applikation von TLR-Liganden und IFN- $\alpha$ <i>in vivo</i> .....	45
2.2.6.3	Probengewinnung aus den Versuchstieren .....	45
2.2.7	Isolierung von totaler RNA aus Zellkultur oder Geweben .....	46
2.2.8	Quantitative <i>realtime</i> PCR .....	47
2.2.9	Nachweis von Proteinen .....	48
2.2.9.1	Extraktion von Proteinen .....	48
2.2.9.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	49
2.2.9.3	Western Blot .....	49
2.2.9.4	Immunhistologische Färbungen .....	50
2.2.9.5	Bestimmung von Serumparametern .....	52
2.2.9.6	Zytokin Nachweis im Serum (Zytokin Array) .....	52
2.2.9.7	HBeAg Nachweis im Serum .....	52
2.2.10	Nachweis der HBV-DNA mittels Southern Blot .....	52

2.2.11	Statistik .....	53
3	Ergebnisse .....	54
3.1	Der Einfluss von siRNA auf das hepatische Immunsystem.....	54
3.1.1	Untersuchung von unterschiedlich modifizierten siRNAs und deren Induktion von zelltyp-spezifischer Immunantwort .....	54
3.1.2	Chloroquin-Behandlung unterbindet die siRNA-vermittelte Immunantwort.....	55
3.1.3	Der siRNA-vermittelte ApoB <i>Knockdown in vitro</i> .....	56
3.1.4	Der siRNA-vermittelte ApoB <i>Knockdown in vivo</i> .....	57
3.1.5	Die lokale und systemische, siRNA induzierte Immunantwort <i>in vivo</i> .....	59
3.1.6	Das durch siRNA aktivierte, hepatische Immunsystem reagiert nicht auf PolyI:C .....	64
3.1.7	Die hepatische Immunantwort <i>in vivo</i> wird durch die NPCs induziert.....	65
3.1.8	Die siRNA induzierte Immunantwort <i>in vivo</i> wird von MyD88-abhängigen Signalkaskaden ausgelöst.....	68
3.2	Der Isg15 <i>Knockdown in vivo</i> und seine therapeutische Relevanz .....	72
3.2.1	Untersuchung des Isg15 <i>Knockdowns in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	72
3.2.2	Anwendung der LNP01-formulierten siRNA in humanisierten chimären Mäusen .....	78
3.2.3	Der Isg15 <i>Knockdown</i> verstärkt die Immunantwort auf exogenes Interferon <i>in vivo</i> .....	80
3.2.4	Der Isg15 <i>Knockdown</i> begünstigt die Immunantwort auf endogenes Interferon <i>in vivo</i> .....	83
3.2.5	Der Isg15 <i>Knockdown</i> unterstützt die Interferon-freie HCV Behandlung.....	85
3.3	Identifikation von Isg15 abhängigen Proteinen .....	87
3.3.1	Funktionelle Charakterisierung des Isg15-Effekts.....	87
3.3.2	Validierung der Isg15-abhängigen Kandidaten aus der Proteom Studie .....	88
3.4	Charakterisierung von HBVtg Mäusen und Suppression der HBV-Replikation mittels siRNA .....	96
3.4.1	HBV transgene Mäuse, denen das HBsAg fehlt, zeigen eine konstitutive Interferonantwort .....	96
3.4.2	<i>In vivo</i> Anwendung von HBV-spezifischer siRNA .....	100
3.4.3	Die HBV-Therapie mit spezifischen siRNAs normalisiert die Interferonantwort... ..	103

---

3.4.4	<i>In vivo</i> Anwendung von unspezifischen siRNAs führt zur HBV-Suppression .	105
3.4.5	Die HBV-induzierte Interferonantwort verändert sich im Lebenszyklus.....	106
3.4.6	Die HBV induzierte Interferonantwort in HBsAg defizienten Tieren ist TLR3 abhängig .....	108
3.4.7	<i>Toll-like</i> Rezeptor Liganden unterbinden die HBV-Replikation <i>in vivo</i> .....	111
3.4.8	HBV supprimiert die TLR-vermittelte hepatische Immunantwort <i>in vivo</i> .....	111
4	Diskussion.....	117
4.1	Chemische Modifizierungen an siRNAs verhindern eine TLR-abhängige Aktivierung des hepatischen Immunsystems .....	117
4.2	Die Vorteile des Isg15 <i>Knockdowns</i> in der HCV Therapie .....	121
4.3	Die pro-virale Funktion von Isg15 in der HCV-Replikation wird durch verschiedene Effektorproteine vermittelt .....	125
4.4	Die angeborene Immunantwort in HBVtg Mäusen mit einem Defizit für das <i>small</i> HBsAg ist <i>Toll-like</i> Rezeptor 3 abhängig.....	128
4.5	Ausblick.....	134
5	Zusammenfassung.....	135
6	Literaturverzeichnis .....	137
7	Anhang.....	157
7.1	Danksagung .....	157
7.2	Wissenschaftliche Veröffentlichungen .....	159
7.3	Lebenslauf .....	170

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<b>A</b>	
Abb.	Abbildung
Acadm	<i>Acyl-Coenzyme A dehydrogenase medium chain</i>
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase (früher GPT)
AST	Aspartat-Aminotransferase (früher GOT)
<b>B</b>	
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
<b>C</b>	
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sub>2</sub> Cl	Kalziumchlorid
cDNA	zu mRNA komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CHB	Chronische Hepatitis-B
CHC	Chronische Hepatitis-C
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Con1	HuH7 basierte HCV subgenomische Replikon Zelllinie
<b>D</b>	
d	Tag ( <i>day</i> )
DAB	3,3'Diaminobenzidin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dsDNA/RNA	Doppelsträngig DNA/RNA ( <i>double stranded DNA/RNA</i> )
<b>E</b>	
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGTA	Ethylglycoltetraacetat

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>extracellular regulated MAP-kinase</i>
<i>et al.</i>	und andere ( <i>'et alteri'</i> )
EtOH	Ethanol
<b>F</b>	
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
<b>G</b>	
g (k,m,μ,n,p)	Gramm (kilo, milli, mikro, nano, piko)
Gardiquimod	TLR7 Ligand
GBSS	<i>Gey's balanced salt solution</i>
<b>H</b>	
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HBcAg	Hepatitis-B core Antigen
HBeAg	Hepatitis-B excretory Antigen
HBsAg (sHBs; mHBs, iHBs)	Hepatitis-B surface Antigen ( <i>small, middle, large</i> )
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBxAg	Hepatitis-B x Antigen
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hepa1-6	Hepatomzelllinie 1-6 murin
Herc5	<i>HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5</i>
Hmgcs1	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase</i>
Hnrnp A3	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i>
Hnrnp K	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSC	Hepatische Sternzellen ( <i>hepatic stellate cells</i> )
HuH7	Humane Hepatomzelllinie 7



## I

i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ldh1	<i>Isocitrate dehydrogenase cytoplasmic</i>
lfi-t1	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
lfn	Interferon
lfn- $\alpha$	Interferon alpha
lfn- $\beta$	Interferon beta
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISG	Interferon stimuliertes/sensitives Gen
ISRE	<i>Interferon sensitive response element</i>
IU	Internationale Einheiten ( <i>international units</i> )

## J

JAK	Janus Kinase
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>

## K

kb	Kilobasen
KC	Kupffer Zellen ( <i>kupffer cell</i> )
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat

## L

l (m, $\mu$ )	Liter (milli, mikro)
LDH	Laktatdehydrogenase (Leberenzym)
LNP	<i>lipid nanoparticles</i>
log <sub>10</sub>	Logarithmus zur Base 10
LSEC	Sinusoidale Leberendothelzellen ( <i>liver sinusoidal endothelia cells</i> )

Lsg.	Lösung
<b>M</b>	
m (k,m,μ,n,p)	Meter (kilo, milli, mikro, nano, piko)
M (m,μ,n,p)	Molar (milli, mikro, nano, piko) = mol / l
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
Max IC <sub>50</sub>	Maximal inhibitorische Konzentration von 50%
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MH1	
min	Minute(n)
mRNA	Boten RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MW	Mittelwert
Mx2	<i>Myxovirus resistance 2</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation marker 88</i>
<b>N</b>	
n	Anzahl der Versuche oder Tiere
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NF-κB	<i>Nuclear factor κ B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NPC	Nicht-parenchymatöse Zellen ( <i>non-parenchymal cells</i> )
NS	Nicht-Strukturproteine
<b>O</b>	
ODN1826	Oligodesoxynucleotide 1826 (TLR9 Ligand)
ORF	Offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
<b>P</b>	
p.i.	Nach Injektion ( <i>post injection</i> )
PAGE	Polyacrylamide Gelelektrophorese
PAMPS	Pathogen assoziierte molekulare Muster ( <i>pathogen associated molecular pattern</i> )
PBS (T)	Phosphatgepufferte Salzlsg. (Tween) ( <i>phosphate buffered saline</i> )

PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
peg	pegyliert
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration [H <sup>+</sup> ]
PKR	Proteinkinase R
PMH	Primäre murine Hepatozyten ( <i>primary murine hepatocytes</i> )
PolyI:C	Polyinosine-polycytidylic acid (TLR3 Ligand)
PRR	Muster-Erkennungs-Rezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
Psmα6	<i>Proteasome subunit alpha type 6</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
<b>Q</b>	
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
<b>R</b>	
RBV	Ribavirin
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAi	RNA-Interferenz
Rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
Rsad2	<i>Radical S-adenosyl methionine domain containing 2</i>
RT	Reverse Transkriptase
<b>S</b>	
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>Standard error of mean</i> )
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
ssDNA/RNA	einzelsträngig DNA/RNA ( <i>single stranded DNA/RNA</i> )
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SVR	<i>Sustained viral response</i>

## T

t	Zeit(punkt) ( <i>time</i> )
Tab.	Tabelle
TBS (T)	Tris-gepufferte Salzlsg. (Tween) ( <i>Tris-buffered saline</i> )
tg	transgen
TIR	Toll/ Interleukin 1 Rezeptor
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor ( <i>toll-like receptor</i> )
Tnf- $\alpha$	<i>Tumor-necrosis-factor alpha</i>
TRIF	<i>TIR domain containing adaptor molecule inducing IFN-<math>\beta</math></i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
Txndc5	<i>Thioredoxin domain-containing protein 5</i>

## U

U	<i>unit</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>

## V

V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (%)
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

## W

W	Watt
w/o	Unbehandelte Kontrolle ( <i>without</i> )
w/v	Gewicht pro Volumen (%) ( <i>weight in volume</i> )
WT	Wildtyp

## X

x	fach
x g	Vielfaches der Gravitation, Erdbeschleunigung

## Z

z.B.	Zum Beispiel
------	--------------

## Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1 Aufbau der Leberläppchen.

Abb.1.2 Zellulärer Aufbau der Leber.

Abb.1.3 Schematische Darstellung des HCV Genoms.

Abb.1.4 Schematische Abbildung des HBV Genoms.

Abb.1.5 Schematische Darstellung der RNA detektierenden Rezeptoren.

Abb.1.6 Schematische Darstellung der IFN Signalkaskaden.

Abb.1.7 Schematische Darstellung des ISGylierungs-Prozesses.

Abb.1.8 Darstellung des Mechanismus der RNA-Interferenz.

Abb.3.1.1 Unterschiedlich modifizierte siRNAs induzieren eine zelltyp-spezifische Immunantwort in isolierten primären Leberzellen.

Abb.3.1.2 Eine Chloroquin-Vorbehandlung hebt die siRNA-vermittelte Immunantwort *in vitro* auf.

Abb.3.1.3 Die *Knockdown* Effizienzen der ApoB siRNAs *in vitro*.

Abb.3.1.4 Nanolipid-formulierte (LNP01) siRNAs supprimieren die hepatische Genexpression *in vivo*.

Abb.3.1.5 Die Applikation der siRNA induziert in verschiedenen Organen eine Immunantwort.

Abb.3.1.6 Unterschiedlich modifizierte siRNAs aktivieren das hepatische Immunsystem.

Abb.3.1.7 Unterschiedlich modifizierte siRNAs erhöhen die Zytokinlevel im Serum.

Abb.3.1.8 HE Färbung von murinem Lebergewebe.

Abb.3.1.9 Ein durch siRNAs vorstimuliertes hepatisches Immunsystem reagiert nicht auf PolyI:C.

Abb.3.1.10 Die siRNA-induzierte hepatische Immunantwort ist auf die NPC begrenzt.

Abb.3.1.11 Reinheitsanalyse anhand zelltyp-spezifischer Marker in PMH und NPC.

Abb.3.1.12 Die siRNA-induzierte hepatische Immunantwort wird durch einen MyD88-abhängigen Signalweg vermittelt.

Abb.3.1.13 Die siRNA-induzierte hepatische Immunantwort wird durch einen MyD88- und JNK-abhängigen Signalweg vermittelt.

Abb.3.2.1 Der Isg15 *Knockdown* und sein Effekt auf die HCV-Replikation.

Abb.3.2.2 Die Isg15 *Knockdown* Effizienzen in unterschiedlichen Leberzellpopulationen.

Abb.3.2.3 Zeitverlauf des Isg15 *Knockdowns* im gesamten Lebergewebe.

Abb.3.2.4 Die Ribose-Modifikationen der Isg15 siRNA verhindern *off-target* Effekte in der Leber.

Abb.3.2.5 Die systemische Wirkung der siRNAs *in vivo*.

- Abb.3.2.6 Hepatozyten und NPC reagieren unterschiedlich auf die LNP01-formulierten siRNAs *in vivo*.
- Abb.3.2.7 Das Isg15 Protein ist nach der Gabe von silsg15 reduziert.
- Abb.3.2.8 Nanolipid-formulierte (LNP01) siSG15 supprimiert die HCV-Replikation in humanisierten, HCV-infizierten Mäusen.
- Abb.3.2.9 Die induzierte ISG Expression nach der Behandlung mit IFN *in vitro* und *in vivo*.
- Abb.3.2.10 Der Isg15 *Knockdown* verstärkt die Immunantwort auf exogenes Interferon *in vivo*.
- Abb.3.2.11 Der Isg15 *Knockdown* verstärkt die Immunantwort auf endogenes Interferon *in vivo*.
- Abb.3.2.12 Therapeutische Optionen für den ISG15 *Knockdown*.
- Abb.3.3.1 Analyse der Isg15-regulierten Gene in MH1 (*in vitro*) und PMH (*in vivo*) im Western Blot.
- Abb.3.3.2 Analyse der Isg15-regulierten Gene in MH1 (*in vitro*) und PMH (*in vivo*) auf Transkriptionsebene.
- Abb.3.3.3 Der Isg15 *Knockdown* reduziert die Transkription aller Kandidatengene im humanen Zellsystem.
- Abb.3.3.4 Der *Knockdown* von Hnnp K supprimiert die HCV-Replikation.
- Abb.3.3.5 Psma6 reguliert die Isg15 Expression.
- Abb.3.3.6 Die Isg15 Überexpression führt zu einer Hnnp K Induktion auf Transkriptions- und Translationsebene.
- Abb.3.3.7 Die Isg15 Überexpression führt zu einer Psma6 Induktion auf Transkriptionsebene.
- Abb.3.4.1 Die HBV Expression in männlichen und weiblichen HBVtg Mäusen unterscheidet sich deutlich.
- Abb.3.4.2 Männliche und weibliche HBVtg Mäuse weisen unterschiedliche, hepatische Zytokin Expressionsprofile auf.
- Abb.3.4.3 Die hepatischen ISG Expressionsprofile unterscheiden HBVtg Tiere von den WT Mäusen.
- Abb.3.4.4 Die Behandlung mit HBx-spezifischer siRNA führt zur HBV-Suppression *in vivo*.
- Abb.3.4.5 Immunhistochemische Analyse des HBcAg.
- Abb.3.4.6 Die Behandlung mit HBx-spezifischer siRNA führt in den Lebern der HBVtg Mäuse zu einer Reduktion der IFN/ISG Expression.
- Abb.3.4.7 Eine nicht-kodierende siRNA supprimiert kurzzeitig die HBV-Replikation *in vivo*.
- Abb.3.4.8 Die HBV-induzierte Interferonantwort verändert sich im Lebenszyklus.
- Abb.3.4.9 Zuchtschema zur Generierung von TLR3<sup>-/-</sup>/HBVtg Mäusen.

Abb.3.4.10 Der *Toll-like* Rezeptor 3 ist in HBVtg Mäusen konstitutiv aktiviert und supprimiert die HBV-Replikation.

Abb.3.4.11 Die *Toll-like* Rezeptor 3 induzierte Immunantwort unterscheidet sich nach 6h signifikant in HBVtg und WT Mäusen.

Abb.3.4.12 Die *Toll-like* Rezeptor 7 induzierte Immunantwort unterscheidet sich nach 24h signifikant in HBVtg und WT Mäusen.

Abb.3.4.13 Die *Toll-like* Rezeptor 9 induzierte Immunantwort unterscheidet sich nur im zeitlichen Verlauf in HBVtg und WT Mäusen.

Abb.3.4.14 Die NF- $\kappa$ B Phosphorylierung ist in HBVtg Mäusen signifikant reduziert.

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.1 Die *Toll-like* Rezeptoren und ihre Liganden

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte

Tabelle 2.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 2.4 Verwendete Medien und Puffer

Tabelle 2.5 Verwendete Kits

Tabelle 2.6 Verwendete Antikörper & Enzyme

Tabelle 2.7 Verwendete siRNAs für die *in vitro* Anwendung

Tabelle 2.8 Verwendete siRNAs, synthetisiert von Roche Kulmbach

Tabelle 2.9 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 2.10 Verwendete QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen

Tabelle 2.11 Verwendete Plasmide

Tabelle 2.12 Verwendete Proteingrößenstandards

Tabelle 2.13 Verwendete Zytokine & TLR-Liganden

Tabelle 2.14 Verwendete Versuchstiere

Tabelle 2.15 Verwendete Hepatomzelllinien

Tabelle 2.16 Verwendete Software

Tabelle 2.17 Zusammensetzung der Transfektionsansätze

Tabelle 2.18 qRT-PCR Programm

Tabelle 2.19 Western Blot Antikörper und ihre Verdünnungen

Tabelle 3.1 Lebertransaminasen im Serum nach siRNA Behandlung

Tabelle 3.2 Quantifizierung des Lichtsignals

Tabelle 3.3 *Knockdown* Effizienzen verschiedener siRNAs in MH1 Zellen

Tabelle 3.4 Lebertransaminasen im Serum der HBVtg Mäuse

Tabelle 3.5 Hepatische *Knockdown* Effizienzen verschiedener siRNAs in HBVtg Mäusen

Tabelle 3.6 Hepatische HBV-Suppression in HBVtg Mäusen, nach TLR-Liganden Injektion.



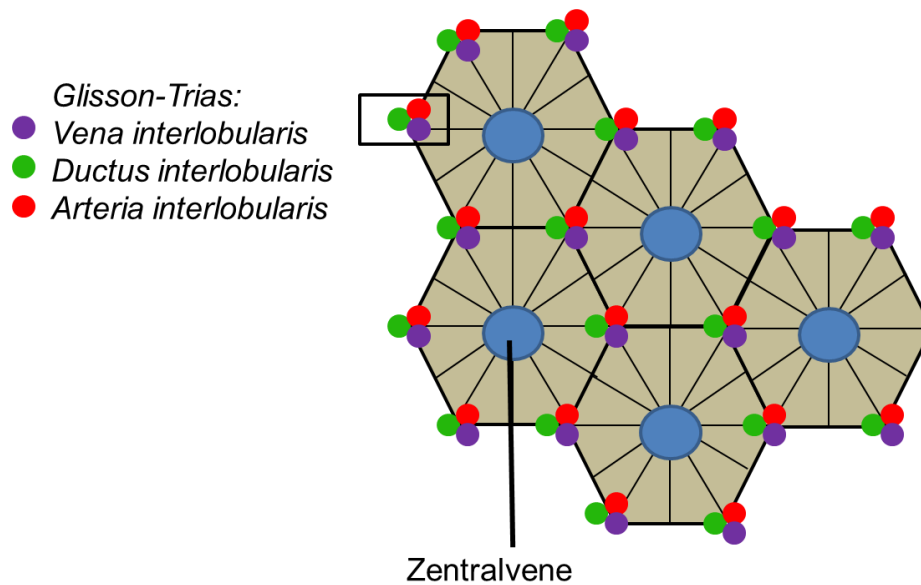
# 1 Einleitung

## 1.1 Die Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan im Körper und mit 1,2 - 1,8 kg die größte menschliche Drüse. Sie baut sowohl körpereigene als auch körperfremde Substanzen ab und wirkt regulierend auf das Immunsystem und den Hormonhaushalt. Im Gastrointestinaltrakt aufgenommene Nährstoffe werden über die Pfortader (*Vena portae*) der Leber zugeführt und gelangen dort über ein verzweigtes Kapillarsystem zu den Hepatozyten, den Parenchymzellen der Leber. Nach der Extraktion der Nährstoffe aus dem Blut findet hier der Metabolismus von Aminosäuren, Kohlenhydraten und Fettsäuren, sowie von Lipoproteinen, Plasmaproteinen (Albumin und Fibrinogen) und Vitaminen statt. Die Leber ist auch ein Speicherorgan, überschüssige Zucker werden in Glykogen umgewandelt und gespeichert, genauso Vitamine und Spurenelemente wie Eisen, Kupfer, Zink und Mangan. Als exokrine Drüse ist die Leber die Synthesestätte der Gallensäure und weiteren Ingredienzien der Galle, welche über den Gallengang (*ductus hepaticus communis*) zur Gallenblase geleitet werden, von wo aus sie in den Darm abgegeben werden. Neben der Synthese- und Speicherfunktion ist die Leber auch ein Entgiftungs- und Exkretionsorgan, welches Gifte, Hormone, Antigene, alte und defekte Zellen, sowie Bakterien aus dem Blut filtert und metabolisiert (Lippert 2003; Gemsa *et al.* 1997). Die Immunabwehr ist eine weitere sehr wichtige Funktion, wobei die Leber hier einen Balance-Akt vollbringt, denn auf infektiöse Pathogene muss mit einer effektiven Immunantwort reagiert werden, wohingegen harmlosen Antigenen aus dem Gastrointestinaltrakt gegenüber eine Toleranz vermittelt werden muss, die für den gesamten Organismus gilt (Knolle & Gerken 2000).

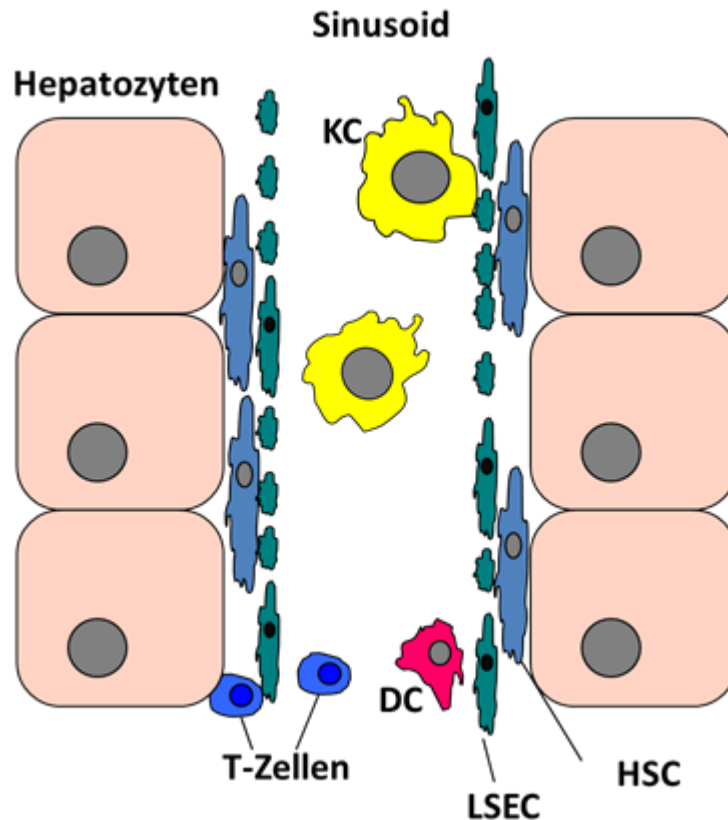
Über die Leberarterie (*Arteria hepatica propria*) wird die Leber mit sauerstoffreichem Blut versorgt, während über die Pfortader (*Vena portae*) Nährstoffe aus Magen und Darm, Hormone aus der Bauchspeicheldrüse (*Pankreas*) und Abbauprodukte der Milz antransportiert werden. Die Leber besteht aus linkem Leberlappen (*lobus sinister*) und rechtem Leberlappen (*lobus dexter*), welche aus je vier Segmenten bestehen und durch eine Furche getrennt sind. Pfortader, Leberarterie, Lymphgefäße und Nerven treten hier in das Organ ein, die Hohlvene und der Gallengang aus. Das Leberparenchym setzt sich aus Leberläppchen oder Zentralvenenläppchen (*Lobuli*

*hepatici*) zusammen, welche von einer Bindegewebsschicht umhüllt sind. Diese Läppchen werden durch die *Arteria interlobularis* (Ast der Leberarterie), die *Vena interlobularis* (Ast der Pfortader) sowie den *Ductus interlobularis* (Gallengang) versorgt und bilden ein Periportalfeld. Diese Konstellation aus *Arteria interlobularis*, *Vena interlobularis* und *Ductus interlobularis* wird als Glisson-Trias bezeichnet (Abb.1.1) (Denk *et al.* 1999).



**Abb.1.1 Aufbau der Leberläppchen.** Schematische Darstellung eines Leberläppchens mit den Periportalfeldern und den Glisson-Trias aus *Arteria interlobularis*, *Vena interlobularis* und *Ductus interlobularis* (Quelle: [www.medizininfo.de](http://www.medizininfo.de)).

Auf zellulärer Ebene setzt sich die Leber aus verschiedenen Zellpopulationen zusammen (Abb.1.2): mit 65% machen die parenchymalen Zellen, die Hepatozyten, den größten Teil von ihnen aus. Die sinusoidalen Endothelzellen (*liver sinusoidal endothelia cells*, LSEC) repräsentieren 20%, die Kupffer Zellen (*kupffer cells*, KC), sowie die hepatischen Sternzellen (*hepatic stellate cells*, HSC), auch Ito-Zellen genannt, jeweils 6% der in der Leber ansässigen Zellen. Diese Zelltypen werden als nicht-parenchymale Leberzellen (NPC) zusammen gefasst, des Weiteren umfassen sie Lymphozyten (T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK)) und dendritische Zellen (DC) (Bertolino *et al.* 2002).



**Abb.1.2 Zellulärer Aufbau der Leber.** Schematische Darstellung eines Leber Sinusoid mit der Lokalisation der verschiedenen Zelltypen: Hepatozyten, sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC), Kupfer Zellen (KC), hepatische Sternzellen (HSC), T-Zellen und dendritische Zellen (DC) (aus Broering, Lu & Schlaak 2011).

Die LSEC kleiden die kapillaren Gefäße (Sinusoide) der Leber aus, hier bilden sie das fenestrierte Endothel (aktiv regulierte Poren) als Barriere zwischen Blut und Hepatozyten. Die LSEC nehmen Makromoleküle über rezeptorvermittelte Endozytose auf und leiten sie zu den angrenzenden Hepatozyten (Transzytose), Leukozyten können hingegen ohne direkten Zellkontakt passieren (Fraser *et al.* 1995).

Die Kupfer Zellen sind residente Makrophagen der Leber, sie sind im Lumen der Leber Sinusoiden zu finden, adhären zu den LSEC. Kupfer Zellen nehmen Pathogene und körperfremde Antigene durch Phagozytose aus dem Pfortaderblut auf und eliminieren diese (Bilzer *et al.* 2006). Sie sind die größte sessile Makrophagenpopulation im Körper und stehen durch ihre Fortsätze in ständigem Kontakt zu LSEC und Hepatozyten (Knolle & Gerken 2000). Genau wie die LSEC nehmen Kupfer Zellen Antigene durch Phago- oder Endozytose auf und

präsentieren diese auf ihrer Zelloberfläche. Zusammen mit der Ausschüttung von pro- oder anti-inflammatorischen Zytokinen vermitteln sie die Toleranz gegenüber diesen Antigenen oder deren Eliminierung durch T-Lymphozyten (Hafenrichter *et al.* 1994; Diehl *et al.* 2008; Wu *et al.* 2010; You *et al.* 2008). Die Sternzellen befinden sich im Dissé-Raum, sie speichern Fette und Vitamine (Vitamin A) (Gemsa *et al.* 1997). Aktiviert sind die Sternzellen an regulativen Prozessen in der Leberregeneration und der Leberschädigung (Fibrogenese) beteiligt.

## 1.2 Hepatitiden

Als Hepatitis wird die Entzündung der Leber beschrieben. Diese kann vielfache Ursachen haben. Trotzdem ist das Krankheitsbild in der Regel einheitlich: es beginnt mit der Schädigung oder Zerstörung der Hepatozyten, daraufhin folgen die Sekretion von Zytokinen und die Einwanderung von Leukozyten und Makrophagen in das betroffene Lebergewebe. Durch die Leberzellschädigung steigen die Transaminasen im Blut an und stellen einen wichtigen diagnostischen Marker dar. Die Stoffwechselfunktion der Leber ist durch den Anteil nekrotischer Hepatozyten eingeschränkt, es kommt unter anderem zum Ikterus. Bei nicht abheilender Entzündung bildet sich Narbengewebe, die Fibrosierung der Leber beginnt, welche zur Zirrhose und der Entstehung von Leberzellkarzinomen (*hepatocellular carcinoma*, HCC) führen kann. Neben der Autoimmunhepatitis sind die Virushepatitiden die häufigste Ursache für eine Hepatitis. Hierzu zählen die Hepatitis-A, -B, -C, -D und –E-Viren (Bowden *et al.* 1996), wobei das Hepatitis-D-Virus nur in Verbindung mit einer Hepatitis-B-Infektion auftreten kann (Heidrich *et al.* 2013). HAV und HEV werden fäkal-oral übertragen, die resultierende akute Hepatitis ist meist selbstlimitierend. Durch Verbesserung von Hygienemaßnahmen und Impfmöglichkeiten sind beide Infektionen eliminierbar. Aufgrund deren herausragender klinischer Relevanz beschäftigt sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) und dem Hepatitis-C-Virus (HCV). Beide werden parenteral übertragen und können zu einer chronischen Hepatitis führen, daraus resultiert häufig eine Leberzirrhose und nachfolgend die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms. Jährlich sterben weltweit rund 600.000 Menschen an den Folgen einer HBV-assoziierten Lebererkrankung, im Fall von HCV mehr als 350.000 Menschen ([www.who.int](http://www.who.int), Stand Juli 2013).

### 1.2.1 Das Hepatitis-C-Virus (HCV)

Weltweit sind über 170 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) infiziert und jedes Jahr infizieren sich weitere 3 - 4 Millionen Menschen ([www.who.int](http://www.who.int), Stand Juli 2013). Die Infektion erfolgt parenteral z.B. über infizierte Blutkonserven, Kanülenstichverletzungen bei Krankenhauspersonal, ungeschütztem Geschlechtsverkehr oder Verwendung von gebrauchten Spritzen bei

Drogenkonsumenten. Die Entwicklung einer Leberzirrhose und eines hepatozellulären Karzinoms in den späteren Infektionsphasen stellen eine relevante Komplikation der HCV-Infektion dar (Habersetzer *et al.* 2012). Das Virus wurde 1989 als Nicht-A-Nicht-B Hepatitis identifiziert (Choo *et al.* 1989) und bis heute gibt es keine effiziente Vakzinierung gegen HCV. Bis 2011 bestand die Standardtherapie aus der Gabe des Virusstatikums Ribavirin (RBV) in Kombination mit pegyliertem Interferon alpha (pegIFN- $\alpha$ ), einem Interferon mit verlängerter Halbwertszeit.

Ein anhaltender Rückgang der Viruslast wird mit IFN-basierten Therapien jedoch, abhängig von virus- und wirtsspezifischen Faktoren, in nur 50-90% der Patienten erzielt (Fried *et al.* 2002; McHutchison & Fried 2003). Die virusspezifischen Faktoren sind z.B. die Viruslast sowie der Virus Genotyp. Weltweit treten die Genotypen 1, 2 und 3 am häufigsten auf. Vor allem der Genotyp 1 ist mit einem schlechten Ansprechen auf IFN basierten Therapie-Ansätzen assoziiert (McOmish *et al.* 1994). Zu den wirtsspezifischen Faktoren zählt zum einen die hepatische Expression von Interferon sensitiven Genen (ISG) vor Therapiebeginn (siehe 1.3.3.1), aber auch der Genotyp des Patienten. Mehrere Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nukleotid polymorphism*, SNP) im Promotor des IL-28B (IFN- $\lambda$ 3) Gens lassen sich ebenfalls mit dem Therapieansprechen von chronisch infizierten HCV Patienten auf die Interferon/Ribavirin Behandlung korrelieren (Ge *et al.* 2009; Thomas *et al.* 2009; Tanaka *et al.* 2009; Suppiah *et al.* 2009). Der bedeutendste ist wohl der SNP rs12979860, wobei Patienten mit dem CC-Genotyp eine signifikant bessere dauerhafte Ansprechrate (*sustained virological response*, SVR) auf die IFN/RBV Therapie aufweisen als Patienten mit einem *non-CC* Genotyp (CT oder TT) (Lin *et al.* 2011).

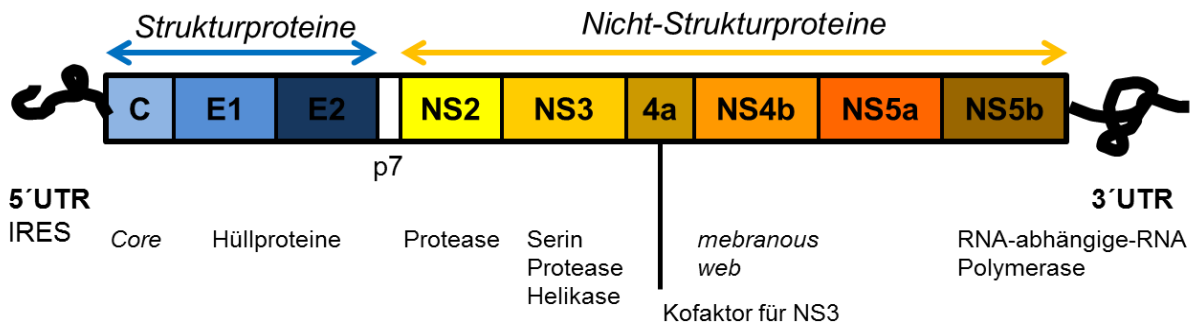
Als Nebenwirkungen der Interferontherapie können grippeähnliche Symptome, Haarausfall und Depressionen auftreten (Schlaak *et al.* 2012; Sulkowski *et al.* 2011). Seit 2011 sind die Protease-Inhibitoren Boceprevir (BOC) und Telaprevir (TVR) in den USA und Europa zur HCV Therapie zugelassen. Beide Wirkstoffe werden kombiniert mit RBV und pegIFN verabreicht, die sogenannte Triple-Therapie (TT). Ersten Studien zufolge wird ein anhaltender Rückgang der Viruslast in 75% der Patienten mit Genotyp 1 erzielt (Jacobson *et al.* 2011).

Die Triple-Therapie birgt jedoch eine Vielzahl an zusätzlichen zu den oben beschriebenen Nebenwirkungen wie Anämie und Hautausschläge und ist zudem für

einige Patienten ungeeignet, z.B. kann bei einer Leberzirrhose eine Kontraindikation vorliegen (Habersetzer *et al.* 2012; Ramachandran *et al.* 2012). Auf Grund der IFN induzierten Nebenwirkungen und der Tatsache, dass IFN subkutan gespritzt werden muss, ist die HCV Therapie der Zukunft eine interferonfreie, orale Therapie (*IFN-free-all-oral regiments*). Erste klinische Studien in diesem Bereich liegen bereits vor; eingesetzt werden neben RBV und den Protease-Inhibitoren noch andere *direct-acting antivirals* (DAA) wie der Polymerase-Inhibitor Sofosbuvir (Gane *et al.* 2013; Poordad *et al.* 2013; Nelson 2009; Pawłowska 2011).

Das HCV ist der einzige Vertreter der Gattung *Hepacivirus* aus der Familie der *Flaviviridae*. Das Virus wird in sieben Genotypen unterteilt, die sich in ungefähr 70 Subtypen einteilen lassen (Smith *et al.* 2013). In den USA und Europa finden sich hauptsächlich die Genotypen 1a, 1b und 3a. Zudem existieren *in vivo* die sogenannten Quasispezies, ein heterogener Schwarm eng verwandter Virus-Varianten innerhalb eines Patienten (McWilliam Leitch & McLauchlan 2013). Durch die ungenaue Transkription und den fehlenden Korrekturmechanismus der RNA-abhängigen RNA-Polymerase kommen hohe Mutationsraten zustande, die für die Entstehung der Quasispezies verantwortlich sind.

Das HCV-RNA-Genom mit positiver Polarität besitzt eine Länge von 9,6 kb und enthält einen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der für ein Polyprotein kodiert. Der ORF wird flankiert von zwei untranslatierten Regionen (UTR). Innerhalb der 5'-UTR befindet sich eine interne Ribosomenbindestelle (*internal ribosomal entry site*, IRES), wo die Translation des Polyproteins initiiert wird. Das Polyprotein wird durch zelluläre und virale Proteasen in 10 Proteine prozessiert, hier werden strukturelle und nicht strukturelle (NS) Proteine unterschieden (Moradpour *et al.* 2007). Zu den Strukturproteinen zählen das Core Protein, welches die virale RNA bindet und für die Bildung des Nukleokapsids verantwortlich ist sowie die Hüllproteine E1 und E2 (*envelope*), diese membranständigen Glykoproteine umhüllen das Kapsid und ermöglichen die Rezeptorbindung an der Zielzelle. Den nicht strukturellen (NS) Proteinen werden das Membranprotein p7 (Viroporin) und die NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B zugeordnet (Abb.1.3). NS2 und NS3 sind Proteasen, NS5B repräsentiert die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase, die anderen nicht strukturellen Proteine sind Kofaktoren, Phosphoproteine (NS5a), Helikasen und NTPasen (Koutsoudakis *et al.* 2013).



**Abb.1.3 Schematische Darstellung des HCV Genoms.** Der einzelne offene Leserahmen (ORF) kodiert ein Polyprotein, das sowohl Strukturproteine als auch Nicht-Strukturproteine enthält. Er wird von untranslatierten Regionen (UTR) flankiert (Quelle: [www.hcvsociety.org](http://www.hcvsociety.org)).

Das HCV weist einen starken Wirts- und Hepatotropismus auf - nur der Mensch ist der natürliche Wirt, aber auch Schimpansen können im Labor infiziert werden. Das bedeutet, es gibt bis heute kein Kleintiermodell, um den Replikationszyklus zu untersuchen. Nagetiere, allen voran die Maus, sind nicht suszeptibel für eine HCV-Infektion. Die Endozytose vermittelte Aufnahme des Apolipoprotein assoziierten Viruspartikels in die Hepatozyten wird von verschiedenen, wirtseigenen Oberflächenproteinen vermittelt, deren Sequenzen in der Maus nicht ausreichend homolog sind, um eine natürliche Infektion zu ermöglichen. Bis heute wurden *low density lipoprotein* Rezeptoren (LDLR), Glykosaminoglykan (GAG) *Cluster of differentiation* 81 (CD81), *Scavenger* Rezeptor *class B member 1* (SCARB1) sowie die *tight junction* Proteine Claudin 1 (CLDN1) und Occludin (OCLN) als Faktoren für die Virusaufnahme identifiziert. Verändert man immunkompetente Mäuse genetisch so, dass sie das humane CD81 sowie humanes Occludin exprimieren, können diese Mäuse mit HCV infiziert werden (Dorner *et al.* 2011). Jedoch repliziert das Virus nicht in diesen Tieren, was bedeutet, dass HCV noch weitere sehr spezifische zelluläre Bestandteile für die Replikation benötigt (Dorner *et al.* 2012). Im murinen System werden Eintritt (*entry*) und Replikation geblockt, während Endozytose, Membranfusionen, *Uncoating*, Translation und Polyprotein-Prozessierung unterstützt werden (Gerold *et al.* 2010). Die Replikationsblockade tritt nach der initialen Translation auf und scheint mit der Membran-assoziierten RNA-Replikation zusammen zu hängen (McCaffrey *et al.* 2002; Ploss & Rice 2009). Die Replikation und Produktion der viralen Partikel finden in der Membran des endoplasmatischen Retikulums statt, hier sind die einzelnen NS-Proteine in räumlicher Nähe zueinander in der Membran verankert. Diese vernetzten Membranstrukturen werden als



*membranous web* bezeichnet (Lohmann 2013; Moradpour & Penin 2013). Für die HCV-Replikation ebenfalls notwendig ist die wirtseigene Lipid- und Lipoproteinsynthese, diese beeinflusst den späteren Aufbau der Viruspartikel (*assembly*), das Ausschleusen der Viruspartikel aus der Zelle (*release*) sowie die Infektiösität der Viren (Bartenschlager *et al.* 2011; Bassendine *et al.* 2013; Sheridan *et al.* 2012).

Eine Möglichkeit für ein murines HCV-Infektionsmodell stellen chimäre Mäuse dar, deren Lebern durch transplantierte humane Hepatozyten repopuliert werden, welche dann wiederum mit HCV (Mercer *et al.* 2001) aber auch mit HBV (Dandri *et al.* 2001) infiziert werden können.

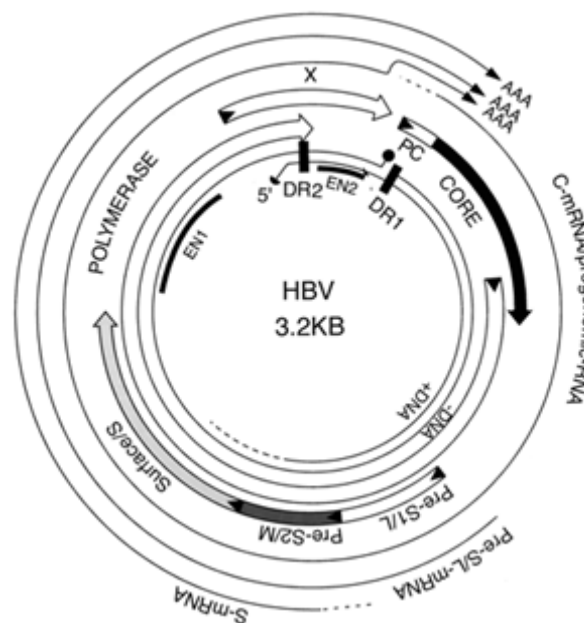
### 1.2.2 Das Hepatitis-B-Virus (HBV)

Das Hepatitis-B-Virus gehört zu den hepatotropen DNA Viren, der Familie der *Hepadnaviridae*. Die Infektion erfolgt meist sexuell oder parental durch den Austausch von Körperflüssigkeiten wie Blut oder Samenflüssigkeit, aber auch in Speichel, Urin, Tränensekret, Galle und Muttermilch können infektiöse Partikel enthalten sein. Das Virus verursacht akute und chronische Leberentzündung. Im Gegensatz zu einer HCV-Infektion kommt es dabei nicht zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems, es fehlt die IFN Antwort (Woltman *et al.* 2011; Wieland *et al.* 2004; Bertoletti & Gehring 2006; Dunn *et al.* 2009), vielmehr blockieren HBV Komponenten die *Toll-like* Rezeptor Signalwege und hemmen somit die Induktion anti-viraler Immunreaktionen (Wu *et al.* 2009). Die HBV Polymerase hemmt die Expression von Interferon sensitiven Genen (ISG), wie Stat1 (*signal transducer and activator of transcription*) und ISG15 (M. Wu *et al.* 2007; Christen *et al.* 2007).

Weltweit sind zurzeit ca. 2 Milliarden Menschen mit HBV infiziert, in über 90% erfolgt eine spontane Ausheilung, in 5-10% kommt es jedoch zur chronischen Infektion. Die Chronifizierungsrate bei Erwachsenen ist geringer (ungefähr bei 5%), sie steigt jedoch mit abnehmendem Lebensalter, die HBV Exposition von Kleinkindern und Babies führt zur Chronifizierung (Bertoletti & Gehring 2006). Derzeit wird die chronische HBV-Infektion mit pegyliertem Interferon sowie mit Nukleosid-/Nukleotidanaloga behandelt. Eine HBV-Infektion kann effektiv durch Vakzinierung mit HBV Oberflächenantigen (HBsAg) verhindert werden (Szmuness *et al.* 1981). HBsAg induziert Anti-HBs Antikörper, die hauptsächlich gegen die zentrale Region des HBsAg, die  $\alpha$ -Determinante, gerichtet sind (Schirmbeck *et al.* 2001; Chen *et al.* 1996; Brown *et al.* 1984), welche dann in der Lage sind, HBV zu neutralisieren und somit eine wichtige Rolle bei der Protektion gegen eine HBV-Infektion spielen. Es ist jedoch bisher nicht bekannt, welche Rolle die Zellen des angeborenen Immunsystems der Leber im Rahmen der Chronifizierung der Hepatitis-B-Virusinfektion einnehmen.

Das Hepatitis-B-*surface*-Antigen (HBsAg) stellt einen wichtigen Bestandteil in der Membranhülle des Virus dar. Im Inneren befindet sich das Nukleokapsid, auch Core-Partikel genannt, eine ikosaedrische Hülle, gebildet durch das Hepatitis-B core Antigen (HBcAg) (Almeida *et al.* 1971). Das Nukleokapsid umschließt das virale Genom, welches als zirkuläre und partiell doppelsträngige DNA vorliegt, wobei der

codierende Minusstrang komplett (3182bp bis 3221pb) und der komplementäre Plusstrang nur partiell vorliegt (1000bp bis 2500bp). Im Gegensatz zu linearen Leserastern überschneiden sich die HBV-Leseraster, was dazu führt, dass das komplette HBV Genom so lang ist wie sein längstes Leseraster (Hruska *et al.* 1977; Robinson *et al.* 1974; Landers *et al.* 1977). Es sind vier offene Leseraster (*open reading frame*, ORF) vorhanden für die DNA-Polymerase (P) (Wollersheim *et al.* 1988), das *surface* Antigen (HBsAg), das *Core* Antigen (HBcAg) und das X-Antigen (HBxAg) kodieren (Liang 2009). Das *surface* Gen kodiert zusammen mit den *upstream* gelegenen Regionen PräS1 und PräS2 für die drei unterschiedlichen Oberflächenproteine, die je nach Translationsbeginn gebildet werden: *Large*, *Middle* und *Small* HBsAg (IHBs, mHBs, sHBs) (Heermann *et al.* 1984). Zusätzlich zum HBcAg kodiert das *Core* bzw. *Präcore* Gen für das Hepatitis-B-e-Antigen (HBeAg), eine trunkierte Form des HBcAg, welches ins Serum sezerniert wird und als diagnostischer Marker verwendet wird (Seeger & Mason 2000). Das HBeAg ist für den viralen Replikationszyklus nicht essentiell, gilt aber als Marker für hohe virale Replikationsraten, so werden z.B. hohe Konzentrationen an sezerniertem HBeAg in Patienten mit einer hohen Viruslast gemessen.



**Abb.1.4 Schematische Abbildung des HBV Genoms.** Das zirkuläre und partiell doppelsträngige DNA Genom weist vier offene Leseraster (ORF) auf. Die Sequenz des HBxAg ist allen gebildeten mRNAs gemein (aus Seeger & Mason 2000).

Die Funktion des HBxAg ist noch nicht hinreichend untersucht, es scheint aber eine Rolle bei der Virusreplikation sowie in der Karzinogenese zu spielen. Die Abb.1.4

zeigt, dass das HBxAg-Transkript in sämtlichen mRNA-Intermediaten der HBV-Replikation vorkommt (Hohne *et al.* 1990; Seta *et al.* 2000). Somit bietet sich diese Sequenz als Ziel für einen siRNA-vermittelten *Knockdown* an, dessen Konsequenz die Herunterregulation aller HBV-RNAs wäre und somit die Replikation gemindert oder sogar gestoppt werden könnte.

Ähnlich wie Retroviren repliziert HBV über eine reverse Transkription (Summers *et al.* 1975; Wollersheim *et al.* 1988) und grenzt sich somit von anderen DNA-Viren ab. Nach Infektion der Wirtszellen (Hepatozyten) wird im Zellkern der unvollständige DNA Plusstrang aufgefüllt und die zirkuläre DNA kovalent geschlossen (Miller *et al.* 1984), es entsteht die cccDNA (*covalently closed circular DNA*), welche lebenslänglich im Nukleoplasma persistiert und in seltenen Fällen trotz klinischer Ausheilung zu einer Reaktivierung einer HBV-Infektion führen kann. Ähnlich wie bei den Retroviren kann die HBV-DNA auch ins Wirtsgenom integriert werden und wird somit bei jeder Zellteilung weiter gegeben. Aus diesem Grund zählt das Hepatitis-B-Virus auch zu den Pararetroviren. Die wirtseigene DNA-abhängige RNA-Polymerase II transkribiert die Virus-DNA in einen RNA-Plusstrang (prägenomische RNA). Im Zytoplasma dient diese zur Translation von Polymerase- und Core-Proteinen, welche inklusive der prägenomischen RNA zu Core-Partikeln zusammengebaut werden. Innerhalb dieser Kapside wird mittels reverser Transkription, ausgehend von der prägenomischen RNA, Minusstrang-DNA synthetisiert, welche dann als Matrize für die Synthese des unvollständigen DNA-Plusstranges dient. Zum Schluss erfolgt die Ummantelung (*encapsidation*) der Kapside durch die membranständigen HBs-Oberflächenproteine, die Bildung des Virions (Hruska *et al.* 1977; Landers *et al.* 1977).

Das in dieser Arbeit verwendete transgene HBV Mausmodell (Tg1,4 HBV-s-mut3) weist das 1,4-fache HBV-Genom auf. Durch eine Punktmutation wird das sHBs gar nicht, die mHBs und lHBs nur in sehr geringen Mengen innerhalb der Leber exprimiert, aber nicht sezerniert. Daher können im Serum dieser Tiere keine infektiösen Partikel und keine HBs-Oberflächenproteine nachgewiesen werden (Halverscheid *et al.* 2008). Dieses Modell stellt ein nicht infektiöses Kleintiermodell (*small animal model*) dar und eignet sich für die Untersuchung des angeborenen Immunsystems sowie zum Einsatz anti-viraler Substanzen.

## 1.3 Das angeborene Immunsystem

### 1.3.1 Mustererkennende Rezeptoren

Das Immunsystem hat die Aufgabe, zwischen körpereigenen und körperfremden Stoffen zu unterscheiden und die fremden Substanzen oder eindringende Organismen zu eliminieren, z.B. Pilze, Bakterien, Parasiten oder Viren. Die angeborene Immunabwehr (*innate immunity*) findet sich bei allen Lebewesen und ist evolutionsgeschichtlich sehr alt. Die Erkennung erfolgt über Rezeptoren, die bestimmte pathogen assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular pattern*, PAMPs) erkennen, ohne dass der Organismus diesen je zuvor ausgesetzt war. Diese Muster (PAMPs) sind hoch konserviert, da sie essentielle Strukturen des Zellaufbaus oder der Replikation der Pathogene darstellen und somit kaum verändert werden. Zusätzlich zum angeborenen Immunsystem entwickelten die Wirbeltiere die adaptive oder erlernte Immunabwehr, die sich an sich ändernde Strukturen verschiedener Erreger anpassen kann. Erst die Kombination beider Systeme führt zu einer komplexen Immunreaktion.

Es gibt drei verschiedene Gruppen von Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR), die *Toll*-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLRs), die *Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like* Rezeptoren (RLRs) und die *Nucleotid oligomerization domain (NOD)-like* Rezeptoren (NLRs). Die NLRs sind hauptsächlich im Zytosol lokalisiert und dort für die Erkennung von bakteriellen Strukturen verantwortlich (Chamaillard *et al.* 2003, S.1). Für die Detektion viraler Strukturen sind hauptsächlich TLRs und RLRs zuständig (Takeuchi & Akira 2009).

Die Nomenklatur der TLRs ergab sich durch die Homologie zum Toll-Rezeptor, entdeckt in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), in der er eine Resistenz gegen Pilzbefall vermittelte. Die TLRs sind membranständige Rezeptoren in direkter Exposition zu den Pathogenen auf der Zelloberfläche oder in Phago- und Endosomen zu finden. Die Stimulation von TLRs durch ihre Liganden führt zu Transkription und Expression von entzündungsfördernden (pro-inflammatorischen) Zytokinen oder Interferonen. Im Menschen sind die TLRs 1 bis 10 identifiziert, in der Maus finden sich neben den TLR1-9, zusätzlich TLR11, TLR12 und TLR13. Mit Ausnahme des endosomalen TLR3 erfolgt die Signalweiterleitung aller TLRs mittels des zytoplasmatischen Adapter-Proteins MyD88 (Myeloider Differenzierungsmarker 88). Der TLR3-vermittelte, MyD88-unabhängige Signalweg, erfolgt über das Adapter-

Molekül TRIF (*Toll-Interleukin-1-resistance (TIR) domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ) und aktiviert die IFN- $\beta$  Expression (Akira *et al.* 2006; Kawai & Akira 2006; Kawai & Akira 2011; Uematsu & Akira 2008). Eine Übersicht alle TLRs, ihrer Liganden und der Lokalisation gibt die Tabelle 1.1.

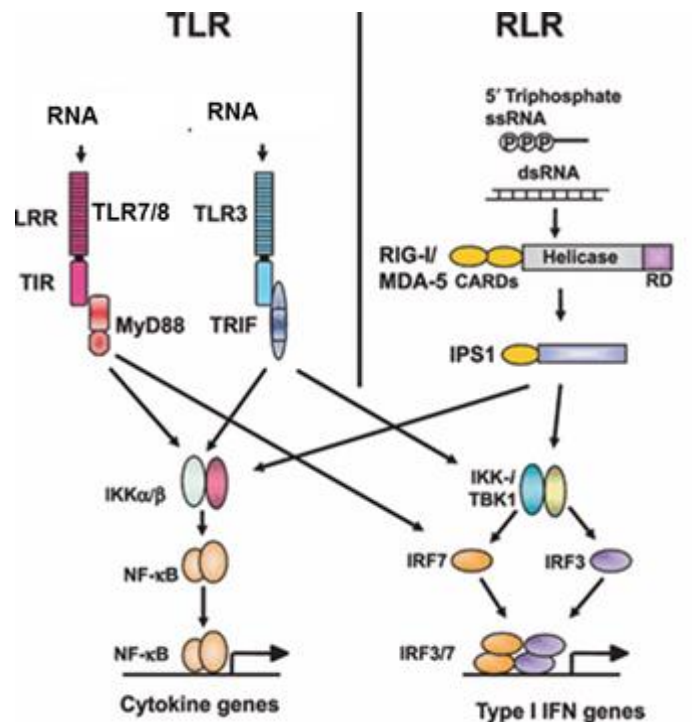
**Tabelle 1.1 Die *Toll-like* Rezeptoren und ihre Liganden**

Rezeptor	Ligand	Pathogen	Zelluläre Lokalisation	Adapter Molekül
TLR1 <sup>1,2</sup>	Triacyl-Lipopeptid	Bakterien	Zelloberfläche	MyD88
TLR2 <sup>1,2</sup>	Lipopeptide/Lipoproteine Peptidoglykan Lipoteichonsäure  Zymosan	Bakterien Bakterien gram-positive Bakterien Pilze	Zelloberfläche	MyD88
TLR3 <sup>1,2</sup>	dsRNA PolyI:C	Virus synthetisch	Endosom	TRIF
TLR4 <sup>1,2</sup>	LPS  Taxol Peptidoglykan Hitzeschockprotein Fibrinogen	gram-negative Bakterien Pflanzen Mykobakterien Wirt Wirt	Zelloberfläche	MyD88 /TRIF/TRAM
TLR5 <sup>1,2</sup>	Flagellin	Bakterien	Zelloberfläche	MyD88
TLR6 <sup>1,2</sup>	Diacyl-Lipopeptide	Mykobakterien	Zelloberfläche	MyD88
TLR7 <sup>1,2</sup>	ssRNA Imidazoquinoline Loxoribine Gardiquimod	Bakterien, Viren synthetisch synthetisch synthetisch	Endosom	MyD88
TLR8 <sup>1,2</sup>	ssRNA Imidazoquinoline	Virus synthetisch	Endosom	MyD88
TLR9 <sup>1,2</sup>	CpG-DNA ODN 1826	Bakterien, Viren synthetisch	Endosom	MyD88
TLR10 <sup>1</sup>	unbekannt	unbekannt	Zelloberfläche	unbekannt
TLR11 <sup>2</sup>	Profilin-ähnliche Moleküle	<i>Toxoplasma gondii</i>	Zelloberfläche	MyD88
TLR12 <sup>2</sup>	unbekannt	unbekannt	unbekannt	MyD88
TLR13 <sup>2</sup>	(bak.) ribosomale RNA	Bakterien (Virus)	Endosom	MyD88

<sup>1</sup> Vorkommen im Menschen;    <sup>2</sup> Vorkommen in der Maus

Virale Strukturen bzw. fremde RNAs werden über die endosomalen *toll-like* Rezeptoren TLR3 (dsRNA), TLR7 (ssRNA) und TLR8 (ssRNA) erkannt. Über die Aktivierung verschiedener Signalwege werden die Transkriptionsfaktoren IRF3 (*interferon regulatory transcription factor 3*), IRF7, AP-1 (*activator protein 1*) oder NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) phosphoryliert,

welche die Expression von IFNs oder pro-inflammatorischen Zytokinen initiieren. Aber auch im Zytoplasma befinden sich Pathogen-erkennende Rezeptoren, die sogenannten RLRs, hierzu zählen RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) und MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*). Mit ihrer Helikase-Domäne detektieren sie die dsRNA im Zytosol und induzieren genau wie die endosomalen TLRs eine IRF3, IRF7 oder NF- $\kappa$ B vermittelte Zytokin Expression und IFN Antwort (schematisch in der Abb.1.5 dargestellt (Takeuchi & Akira 2009)).



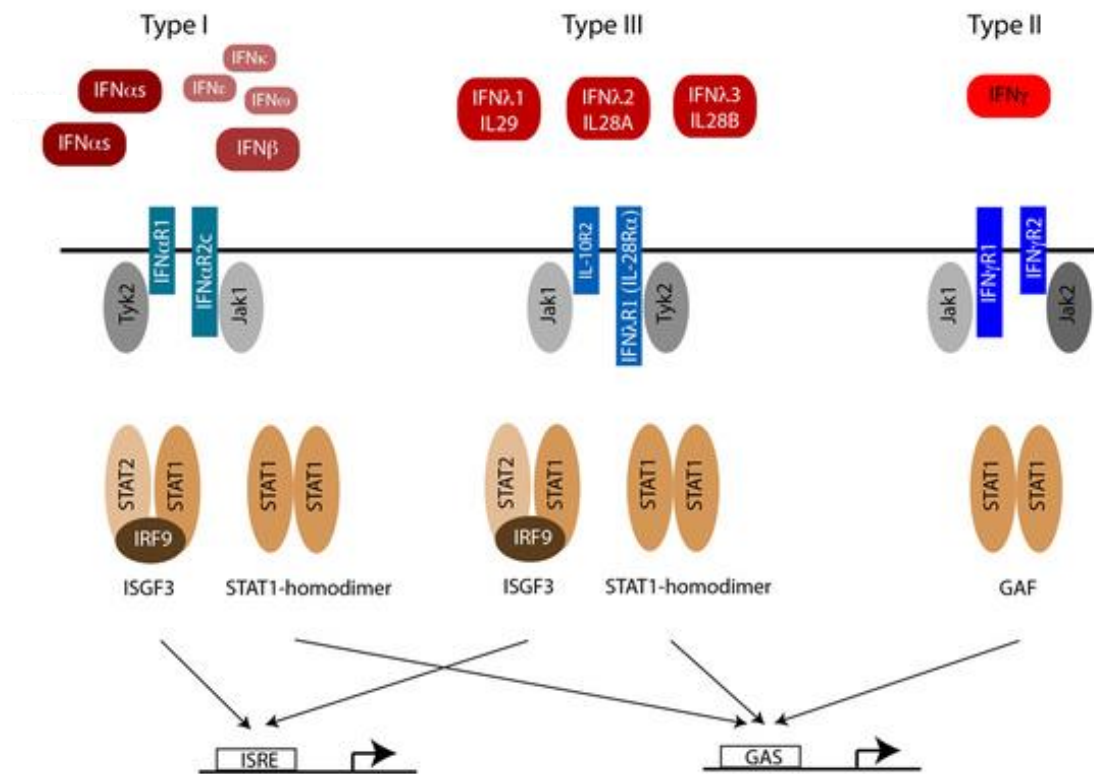
**Abb.1.5 Schematische Darstellung der RNA detektierenden Rezeptoren.** RNAs können mittels verschiedener Rezeptoren (TLR und RLR) detektiert werden und führen über eine Kaskade von Effektormolekülen mittels verschiedener Phosphorylierungsschritte zur Aktivierung von IRF3, IRF7 und NF- $\kappa$ B. Diese translozieren in den Nukleus und induzieren die Expression von Zytokinen und IFN (aus Takeuchi & Akira 2009).

### 1.3.2 Interferone

Interferone (IFN) werden seit 1957 den sekretierten Zytokinen zugeordnet (Isaacs & Lindenmann 1987). Sie wirken immunstimulierend und haben vor allem anti-virale wie anti-tumorale Eigenschaften. Man unterscheidet verschiedene Typen: Typ I, Typ II und Typ III Interferone. Zu den Typ I IFN gehören diverse Moleküle mit verschiedenen biologischen Eigenschaften, wie IFN- $\alpha$  (Leukozyten IFN) und IFN- $\beta$  (Fibroblasten IFN), sowie IFN- $\omega$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\delta$  und IFN- $\kappa$ . Das Gamma IFN (IFN- $\gamma$ ) ist der einzige Vertreter der Typ II Interferone, exprimiert wird es in T-Lymphozyten und NK-Zellen, reguliert durch Zytokine. Typ II IFN aktiviert Makrophagen und verstärkt ihre antimikrobielle Aktivität. Die Lambda IFN (IFN $\lambda$ ) bilden die Gruppe der Typ III IFN, zu ihnen zählen IL-28A (IFN- $\lambda$ 2), IL-28B (IFN- $\lambda$ 3) und IL-29 (IFN- $\lambda$ 1). Diese werden auch im Laufe verschiedener Virusinfektionen exprimiert und haben eine anti-virale Wirkung (Robek *et al.* 2005; Ank *et al.* 2006).

Interferone spielen eine essentielle Rolle in der frühen wirtseigenen Abwehr gegen virale Infektionen, sie wirken para- wie auch autokrin. Interferone binden an ihre spezifischen Rezeptoren (Typ I: IFNAR1, IFNAR2; Typ II: IFNGR1, IFNGR2; Typ III: IL10R2, IFNLR1) und aktivieren den Jak (*Janus activated kinase*)/STAT (*Signal transducer and activators of transcription*) Signalweg (Uzé & Monneron 2007) (Abb.1.6).





**Abb.1.6 Schematische Darstellung der IFN Signalkaskaden.** Die Bindung der IFN an ihren spezifischen Rezeptor, aktiviert die Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen (Jak1, Jak2 und Tyk2), welche STAT1 und STAT2 phosphorylieren. Diese Phosphorylierung führt zur Heterodimerisierung der STATs, welche in den Nukleus translozieren, wo sie mit IRF9 interagieren, einem DNA-bindenden Protein. Dieser Komplex bindet an das ISRE (*Interferon sensitive response element*) und aktiviert die Transkription diverser Gene. Alternativ kann STAT1 auch homodimerisieren und bindet im Zellkern an die GAS (Gamma-IFN-aktivierte Stelle) (aus Heim 2012).

Die Aktivierung dieser Signalwege induziert die Transkription von einigen hundert Genen, welche die virusinfizierte Zelle in einen anti-viralen Zustand versetzen. Sowohl in der HCV- als auch in der HBV-Therapie werden Typ I IFN eingesetzt. Unter dem Selektionsdruck der anti-viral wirkenden IFN entwickeln unterschiedliche Viren in einem evolutionären Prozess verschiedene Ausweichstrategien, um sich dem Angriff des Immunsystems zu entziehen (Samuel 2001).

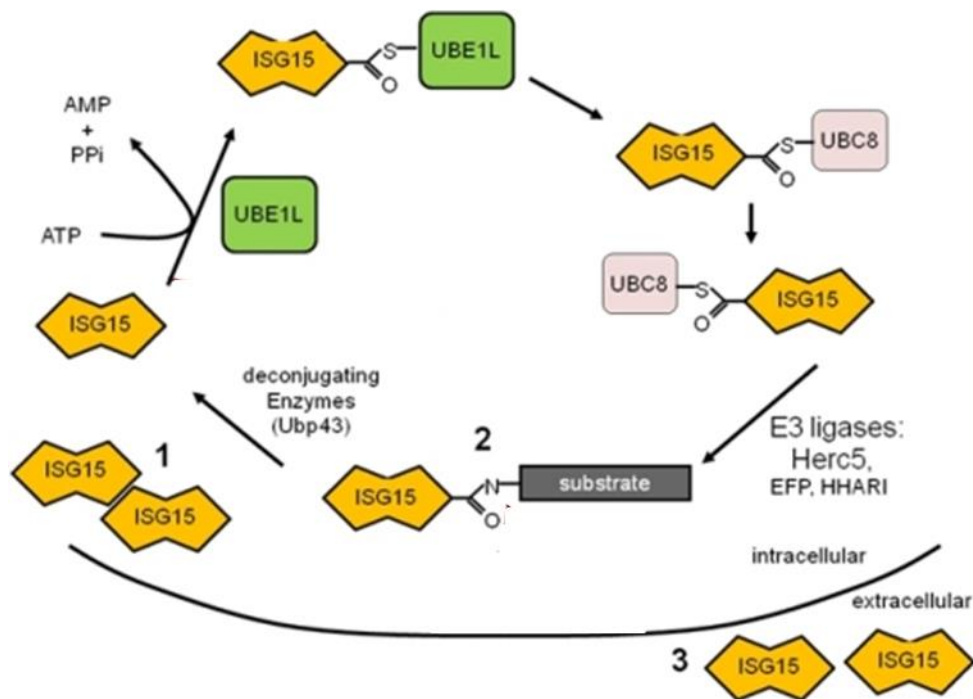
### 1.3.3 Interferon sensitive Gene (ISGs)

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben binden die Interferone an ihre spezifischen Rezeptoren und der Jak/STAT (*Januskinase/Signal transducers and activators of transcription*) Signalweg wird aktiviert, welcher die Expression von Interferon sensitiven Genen (ISGs) induziert (Dickensheets *et al.* 2012). Zu den anti-viralen ISGs zählen unter anderem RNA-abhängige Proteinkinase R (PKR), die 2',5'-

Oligoadenylatesynthetase (OAS) und die RNase L genauso wie die Mx-Protein-GTPasen aber auch die Interferone selbst (Sadler & Williams 2008; Samuel 2001). Diese ISGs werden wiederum durch (virale) dsRNA aktiviert. Die aktivierte PKR verhindert die Translation viraler und zellulärer Proteine und kann sogar Apoptose auslösen, virusinfizierte Zellen sterben ab und deren Inhalt wird degradiert (Garcia-Sastre & Biron 2006). OAS aktiviert ihrerseits RNase L, welche zelluläre und virale RNAs degradiert (Silverman 2007). Die Mx-Proteine sorgen für die Absonderung viraler Ribonukleoproteine in spezifische Zellkompartimente (Haller *et al.* 2007). Eine besondere Stellung nimmt das Interferon sensitive Gen 15 (ISG15) ein, da es in der HCV-Infektion eine pro-virale Rolle spielt (Broering *et al.* 2010; Chen, Sun, *et al.* 2010)

#### **1.3.3.1 Das Interferon sensitive Gen 15 (ISG15) und seine Rolle in der HCV-Infektion**

Eines dieser Interferon sensitiven Gene ist ISG15, ein 15 kDa großes Protein, entdeckt 1979 als Ubiquitin ähnliches Protein (Farrell *et al.* 1979). Ähnlich der Ubiquitinylierung wird ISG15 an viele zelluläre Proteine konjugiert, analog ISGylierung genannt. Am Prozess der ISGylierung sind das aktivierende Enzym E1 (Ube1L), das konjugierende Enzym E2 (UbcH8) und E3 Ligasen (EFP, HHARI und Herc5) beteiligt, sie alle sind auch durch Interferone induzierbar. Die Ubiquitin spezifische Protease 18 (USP18 oder Ubp43) löst die Bindung zwischen ISG15 und dem Zielprotein wieder (Abb.1.7). Die Arbeitsgruppe um Zhao identifizierte 158 zelluläre Proteine, welche isgyliert werden, unter ihnen auch andere ISGs, wie PKR, MxA und RIG-I. Generell ist die Gruppe an isgylierten Proteinen sehr heterogen, die meisten von ihnen werden konstitutiv exprimiert und spielen in diversen Signalwegen eine Rolle, wie in der RNA Prozessierung, der Chromatin Remodellierung, der Zytoskelett-Organisation, der zellulären Stressantwort und in der Translation (Zhao *et al.* 2005).



**Abb.1.7 Schematische Darstellung des ISGylierungs-Prozess.** Nach einem IFN Stimulus wird freies intrazelluläres ISG15 hochreguliert (1), dieses wird über die Enzyme E1 (Ube1L), Enzym E2 (UbcH8) und E3 (EFP, HHARI und Herc5) an Zielproteine konjugiert (2) oder in den extrazellulären Raum sekretiert (3). Das dekonjugierende Protein in diesem Prozess ist das Ubp43/Usp18 (aus Lenschow 2010).

Die ISGylierung scheint eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr zu spielen. Für viele Viren wie Herpes, Sindbis, Influenza und das humane Immundefizienz-Virus (HIV) wird ISG15 als anti-viraler Faktor beschrieben (Lenschow *et al.* 2005; Lenschow *et al.* 2007). Bei der HCV-Infektion spielt ISG15 jedoch eine pro-virale Rolle. Die hepatische ISG Expression unterscheidet die *Responder* von den *Non-Respondern* in Genotyp 1 infizierten Patienten unter der Standardtherapie pegIFN und Ribavirin (bis 2011) (Asselah *et al.* 2008; Chen *et al.* 2005; Sarasin-Filipowicz *et al.* 2008). Hierbei zeigt sich, dass eine erhöhte ISG15 Expression in den Hepatozyten von Patienten mit einer hohen hepatischen Viruslast oder einem schlechten initialen anti-viralen Ansprechens auf IFN korreliert. IFN-*Responder* hingegen zeigen eine erhöhte ISG15 Expression in den Kupffer Zellen (KC), was mit gutem Therapieansprechen korreliert (Chen, Borozan, *et al.* 2010). Auch in Schimpansen mit einer chronischen HCV-Infektion wurde eine erhöhte hepatische ISG-Expression festgestellt. In diesen Tieren war ebenfalls keine Antwort auf exogen verabreichtes Interferon detektierbar (Lanford *et al.* 2007). Das gleiche Phänomen wurde auch für chronisch infizierte HBV Patienten in der Literatur beschrieben: Erhöhte ISG15 Level in Hepatozyten korrelieren auch hier mit nicht Ansprechen auf die Interferon Therapie (Zhu *et al.* 2012; Xiao *et al.* 2012).

Wie oben beschrieben lassen sich mehrere Einzelnukleotid-Polymorphismen im Promotor des IL-28B Gens mit dem Therapieansprechen von chronisch infizierten HCV Patienten auf die Interferon/Ribavirin Behandlung korrelieren (Ge *et al.* 2009; Thomas *et al.* 2009; Tanaka *et al.* 2009; Suppiah *et al.* 2009). Es wird diskutiert, ob die hepatische ISG Expression in chronisch infizierten HCV Patienten mit dem IL-28B Genotyp in Zusammenhang steht (Urban *et al.* 2010) oder ob dies zwei unabhängige Phänomene sind (Dill *et al.* 2011). In einem gleichen sich jedoch beide Publikationen: eine erhöhte ISG Expression vor Therapiebeginn ist ein Indikator für Therapie *non-response*.

Ein weiterer Faktor in der HCV-Replikation ist die hepatisch exprimierte Micro-RNA-122 (miR-122). Erstmals wurde 2005 gezeigt, dass miR-122 die Replikation des Hepatitis-C-Virus unterstützt (Jopling *et al.* 2005). Jedoch korrelieren die hepatischen miR-122 Level nicht mit der hepatischen ISG Expression oder dem IL-28B Genotyp *in vivo* (Urban *et al.* 2010). Mit Miravirsen ist das erste RNAi-basierte Medikament gegen HCV in einer klinischen Studie (Janssen *et al.* 2013). Die siRNA-vermittelte Suppression von ISG15 im murinen sowie im humanen HCV replizierenden Zellkultursystem führt zu einer Hemmung der viralen Replikation, die mit dem durch IFN vermittelten Effekt vergleichbar ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der durch ISG15 *Knockdown* vermittelte anti-virale Effekt unabhängig vom IFN Signalweg ist. Ein ISG15 Langzeit-*Knockdown* über 3 Monate führt zu einer stabilen Suppression der HCV-Replikation um 80-90% ohne Resistenzentwicklung. Des Weiteren konnte eine 5-fach gesteigerte HCV-Replikation im Rahmen einer ISG15 Überexpression gezeigt werden, so dass sich ein direkter Zusammenhang zwischen Virusreplikation und ISG15 Expression vermuten lässt (Broering *et al.* 2010). Zum einen fördert ISG15 die HCV-Replikation (Broering *et al.* 2010; Chen, Sun, *et al.* 2010) und zum anderen ist es Teil eines Regulationsmechanismus, welcher die Effizienz der Interferon-Antwort minimiert. Die siRNA-basierte Suppression der ISG15 RNA führt zusätzlich zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber therapeutisch eingesetztem IFN *in vitro* (Broering *et al.* 2010; Chua *et al.* 2009).

Die Suppression von ISG15 mittels siRNA bietet daher einen möglichen Angriffspunkt für neue HCV Therapieansätze.

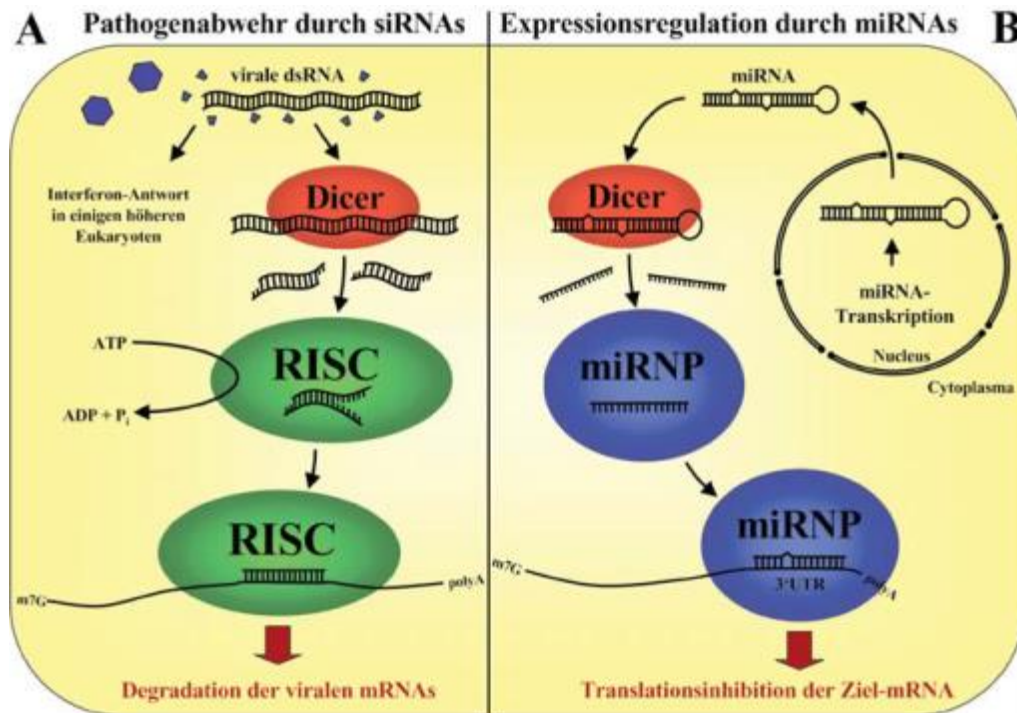
## 1.4 RNA-Interferenz (RNAi)

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein zellulärer Prozess, durch den ein gezieltes Ausschalten einzelner Gene herbeigeführt wird (engl. *knockdown*). Bei der Untersuchung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* wurde 1998 der Mechanismus der RNA-Interferenz als posttranskriptionale Genblockade (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) beschrieben. Durch den Einsatz von dsRNA wird die komplementäre mRNA degradiert oder inhibiert (Fire *et al.* 1998). 2006 erhielten Andrew Fire und Craig Mello für diese Entdeckung den Nobelpreis. Zuvor wurde der Effekt der RNAi schon in Pflanzen (Napoli *et al.* 1990) und Pilzen (Romano & Macino 1992) beschrieben. Die RNAi ist ein natürlicher, regulatorischer Mechanismus der Zelle zur Expressionskontrolle endogener als auch exogener Gene, z.B. ein Schutzmechanismus bei der Verteidigung gegen Viren, molekularen Parasiten und Transposons (Martinez *et al.* 2003; Tuschl & Borkhardt 2002). Weitere Funktionen der RNAi scheinen die Elimination von defekten mRNAs (Plasterk 2002) und die Regulation von Proteinen als Reaktion auf Umwelt-Stimuli zu sein (McManus & Sharp 2002). Mittlerweile sind neben mRNA, rRNA und tRNA eine Vielzahl von kurzen, regulatorischen, nicht-proteinkodierenden Ribonukleinsäure-Molekülen bekannt (ncRNAs) (Pillai *et al.* 2007).

### 1.4.1 RNAi ist ein hoch konservierter eukaryotischer Mechanismus

Exo- (virale RNA) oder endogene (microRNA) dsRNA aktiviert in der Zelle eine Ribonuklease vom Typ III, *Dicer*, welche die Moleküle in 21-23bp lange Fragmente spaltet, den sogenannten *small interfering* RNAs (siRNA) (Bernstein *et al.* 2001; Ketting *et al.* 2001). Diese umfassen eine 19 Nukleotide lange Doppelstrang Region, phosphorylierte 5'-Enden, sowie zwei bis drei unpaare Nukleotide am freien 3'-Hydroxyl-Ende. Die siRNA bindet an den Multienzym-Komplex RISC (*RNA induced silencing complex*), diese Bindung benötigt die 5'-Phosphorylierung des siRNA. Die dsRNA wird unter ATP Verbrauch entwunden und der *Sense*-Strang, homolog zur zelleigenen mRNA, zerstört. Hingegen bleibt der *Antisense*-Strang an RISC gebunden und bindet spezifisch durch komplementäre Basenpaarung an die Ziel-mRNA. Ist eine exakte Basenpaarung möglich, wird die gebundene mRNA durch die Nuklease-Untereinheit AGO2, auch *Slicer* genannt, am Phosphodiester-Rückgrat gespalten und die entstehenden Fragmente im Zytoplasma durch zelleigene RNasen

degradiert (Agrawal *et al.* 2003). Dieser Vorgang ist schematisch in Abb.1.8 abgebildet.



**Abb.1.8 Darstellung des Mechanismus der RNA-Interferenz.** Virale dsRNA in einer Zelle wird vom Dicer enzymatisch in 21-23bp lange Fragmente zerlegt (siRNA), welche im RISC-Komplex zu Einzelsträngen prozessiert werden. Die Bindung des aktivierten Komplexes an die Ziel-mRNA vermittelt deren Abbau (A). Micro-RNAs (miRNAs) sind endogene dsRNAs, welche alleine der Translationskontrolle dienen (B) (aus Eggert & Fischer 2003).

#### 1.4.2 Therapeutischer Einsatz von siRNA

Im letzten Jahrzehnt ist der Einsatz der RNAi Technologie zu einer Standard Methode im Labor geworden, hauptsächlich um spezifische Genfunktionen zu untersuchen. Synthetisch hergestellte RNAs werden in Säugerzellen (*in vitro*) bzw. systemisch (*in vivo*) appliziert und aktivieren dort zielgerichtet den zellulären RNAi Mechanismus (Caplen *et al.* 2001; Elbashir *et al.* 2001). Auch für therapeutische Zwecke hat die RNAi schnell Anwendung gefunden, im Vordergrund stehen hier virale Infektionen (Silva *et al.* 2002), Krebs (Borkhardt 2002) und dominant vererbte, genetische Krankheiten. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass die Replikation des HIV durch spezifische siRNA gegen virale Gene im Zellkulturmodell inhibiert wird (Capodici *et al.* 2002; Coburn & Cullen 2002). In verschiedenen HBV Mausmodellen wurde *in vitro* (Shlomai & Shaul 2003) sowie *in vivo* auch schon siRNA gegen das

Hepatitis-B-Virus eingesetzt (McCaffrey *et al.* 2003; Ren *et al.* 2013; Wooddell *et al.* 2013).

Allein die Suche nach einer geeigneten siRNA Sequenz stellt eine Herausforderung dar, denn die zur mRNA komplementäre siRNA sollte nur 19-21 Nukleotide lang sein, und nicht jede willkürlich gewählte Sequenz führt zum gewünschten Gen *Knockdown*. Hier können computerbasierte Modelle und *online* Algorithmen und Datenbanken Abhilfe schaffen (Chalk *et al.* 2005).

Um siRNA therapeutisch *in vivo* einsetzen zu können, müssen jedoch weitere Herausforderungen gelöst werden. Nach systemischer Applikation dürfen die siRNAs nicht enzymatisch durch RNasen im Serum oder Zytoplasma degradiert werden, „nackt“ beträgt ihre Halbwertszeit im Serum wenige Minuten bis zu einer Stunde (Behlke 2006). Pegylierte siRNAs weisen beispielsweise eine höhere Serumstabilität und geringere Toxizität auf (Dassie *et al.* 2009). Das nächste Problem sind die Gewebespezifität sowie das Passieren der jeweiligen Zellmembranen. Als negativ geladenes Molekül kann die siRNA die Zellmembran nicht durchdringen. Durch die Modifikation mit verschiedensten Molekülen, wie z.B. Cholesterol, wird eine rezeptorvermittelte Aufnahme ermöglicht bzw. die Membranpermeabilität erhöht (Soutschek *et al.* 2004). Weiterhin können Nebenwirkungen (*off-target effects*) auftreten, ausgelöst durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems, welches auf fremdartige RNA reagiert (Szabo & Rajnavolgyi 2013). In mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), wird die siRNA-abhängige Aktivierung des Immunsystems *in vitro* über endosomale TLRs vermittelt, resultierend in IFN- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  Expression (Sioud 2005; Zamanian-Daryoush *et al.* 2008). *In vivo* konnte die TLR7-abhängige Aktivierung anhand von TLR7 *Knockout* Mäusen gezeigt werden, welche, nach siRNA Applikation, eine reduzierte IFN- $\alpha$  Konzentration im Serum aufwiesen (Hornung *et al.* 2005). Das hepatische Immunsystem ist ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen, die immunstimulatorischen Auswirkungen von siRNAs auf dieses System sind bisher noch unzureichend untersucht (Broering, Lu & Schlaak 2011).

Die siRNA-vermittelten Immunreaktionen können durch spezifische Modifikationen am Ribose-Rückgrat der siRNA unterbunden werden, gezeigt *in vitro* in PBMCs (Manoharan *et al.* 2011). Um siRNAs therapeutisch einzusetzen, wird ein effizientes, zuverlässiges und sicheres *delivery tool* benötigt (Gavrilov & Saltzman 2012).

Die Verwendung von Lipidnanopartikeln (LNP) als *delivery* Reagenz zeigte, dass die siRNA Dosis für einen effizienten *Knockdown* reduziert werden konnte, was auch für eine ausreichende Serumstabilität spricht (Zimmermann *et al.* 2006). Bei intravenöser Applikation akkumulieren LNPs in Leber und Milz, eine Methode, die schon vor der Entdeckung der siRNAs bekannt war (Soni *et al.* 1998). Studien in nicht-menschlichen Primaten haben gezeigt, dass LNP-formulierte siRNAs zu einem leberspezifischen *Knockdown* führen, aber keine Toxizität aufweisen, die hepatischen Aminotransferasen (AST, ALT) waren nach Applikation nicht erhöht (Zimmermann *et al.* 2006; Frank-Kamenetsky *et al.* 2008). Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Leber lipid-gekoppelte siRNAs einen *Knockdown* in murinen Hepatozyten erzielen. Mäuse wurden mit einer spezifischen siRNA gegen den Blutgerinnungsfaktor VII intravenös behandelt. Faktor VII wird ausschließlich in Hepatozyten produziert und ins Blut sekretiert. Anhand von Blutanalysen konnte der Faktor VII *Knockdown* nachgewiesen werden (Love *et al.* 2010). Da diese Studie ein Protein untersucht hat, welches ausschließlich in Hepatozyten produziert wird, zeigt sie nicht, ob sich die siRNA auch in den nicht-parenchymalen Leberzellen akkumuliert. In dieser Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, ob ein LNP01-siRNA-vermittelter *Knockdown* auch in nicht-parenchymalen Leberzellen auftritt.

Mittlerweile befinden sich einige siRNA-basierte Therapeutika in klinischen Studien im Einsatz gegen altersbedingte Makuladegeneration, Typ 2 Diabetes, Krebs, akute Nierenschädigung, Parkinson, HIV-Infektionen, Adipositas, Atemwegsinfektionen, Gelenkrheumatismus, Hypercholesterolämie und amyotrophe Lateralsklerose (Castanotto & Rossi 2009; Keaney *et al.* 2011). Speziell für die Behandlung von Hepatitiden ist das Medikament Miravirsen in der klinischen Studie Phase II. Miravirsen reguliert mittels RNAi Technologie die hepatische miR-122 und hat damit einen suppressiven Effekt auf die HCV-Replikation in chronisch infizierten Patienten (Janssen *et al.* 2013).



## 1.5 Zielsetzung

Sowohl HBV als auch HCV sind noch nicht komplett heilbar, hier bietet der Einsatz von siRNAs einen vielversprechenden Behandlungsansatz, da siRNAs das gezielte Eingreifen in die Genregulation einer Zelle ermöglichen, wodurch z.B. krankheitsrelevante Gene inhibiert werden können. Um den therapeutischen Einsatz von siRNAs zu ermöglichen, ist es maßgeblich, die genauen Wirkungsmechanismen auf das Immunsystem zu kennen. Der Nachteil bei der Verwendung von siRNAs *in vivo* war bisher, dass wenige geeigneten *delivery tools* zur Verfügung standen um eine gewebs- bzw. zellspezifische Gensuppression zu gewährleisten. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit orientiert sich an der Charakterisierung und Analyse des Einsatzes von siRNAs im Mausmodell. Die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs sind in Kooperation von der Firma Roche Kulmbach (heute Axolabs GmbH, Kulmbach) zur Verfügung gestellt worden und sollten auf ihre Gen- und Gewebe-/Zellspezifität *in vivo* untersucht werden.

1. Zuerst sollte gezeigt werden, welche Nebenwirkungen, sogenannte *off-target* Effekte, bei dem Einsatz von siRNAs *in vivo* auftreten. Die lokale und systemische Aktivierung des Immunsystems sollte mit wirtsspezifischen als auch unspezifischen siRNAs *in vitro* an murinen Leberzellpopulationen, sowie *in vivo* an immunkompetenten Mäusen und *Knockout* Mausstämmen (Myd88<sup>-/-</sup> und TLR3<sup>-/-</sup>), untersucht werden. Durch unterschiedliche chemische Modifikationen der siRNAs sollten *off-target* Effekte unterbunden oder gezielt induziert werden.
2. Nach der Etablierung einer siRNA-vermittelten Gen-Suppression *in vivo* sollten anhand des spezifischen Isg15 *Knockdowns* bearbeitet werden, welche *Knockdown* Effizienzen und welche *Knockdown* Dauer in verschiedenen Geweben bzw. Leberzellpopulationen definiert werden können. Des Weiteren sollte das Ansprechen des Immunsystems auf zusätzliche Immunmodulatoren wie Interferon und PolyI:C nach der Isg15 Suppression *in vivo* untersucht werden.
3. In einer vergleichenden Studie zwischen dem erzielten Isg15 *Knockdown in vivo* und *in vitro*, in HCV-Replikon Zellen, sollte mittels Proteomanalysen die

zellulären Funktionen von Isg15 näher determiniert werden. Dies sollte weitere Erkenntnisse zu der Rolle von Isg15 in der HCV-Replikation liefern.

4. Im HBV Mausmodell sollte durch den Einsatz HBV-spezifischer siRNA gegen die viralen Gene HBxAg und HBV Polymerase, der direkte Effekt von siRNA auf die Virusinfektion untersucht werden. Hierbei standen, neben der Suppression der viralen Replikation, auch die Auswirkungen auf das Immunsystem im Fokus.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Autoklav 2540 EL und Systec VX-150	Systec GmbH, Wettenberg
Avanti™ Zentrifuge J-25	Beckman Coulter, Krefeld
CO <sub>2</sub> Inkubatoren Hera Cell	Heraeus, Hanau
CO <sub>2</sub> Inkubatoren Heraeus BB15	Thermo Scientific
EBECO IK-M Impfkäfig für Mäuse	BIOSCAPE GmbH, Castrop-Rauxel
ELISA Reader ELx808	BIO-TEK Instruments, Bad Friedrichshall
Elutriator JE-65 zur Nutzung in Avanti™ Zentrifuge J-25	Beckmann Coulter, Krefeld
Feinwaage AT261 DeltaRange	Mettler Toledo, Giessen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan mit der Kamera AxioCam HRc	Zeiss, Jena
Fusion FX-advanced	Vilber Lourmat, Eberhardzell
HYBAID OmniGene Heizblock	Thermo HYBAID GmbH, München
Inkubationsschüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific/Eppendorf, Hamburg
Inverses Gewebekulturmikroskop TMSF	Nikon GmbH, Düsseldorf
Luminometer Fluorostar Optima	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mini-PROTEAN® Tetra cell	Bio-Rad, München
Multipette stream®	Eppendorf, Hamburg
Multipette® M4	Eppendorf, Hamburg
PCR Maschinen: Mastercycler ep realplex CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Eppendorf, Hamburg Bio-Rad, München
Peristaltikpumpe Masterflex 77200-50	Cole Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA
pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten ( <i>research plus</i> ): 0,1-2,5µl, 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, elektrisch	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schüttler Certomat TC3	B.Braun Biotech International, Melsungen
Spotchem™ EZ SP-4430	Akay, Kyojo, Japan
Sterilwerkbänke LaminAir® Safe 2020 Class II Biological Safety Cabinet Sterilwerkbank ( <i>Biological Safety Cabinet Class II</i> )	Heraeus, Hanau Thermo Scientific NuAir, Plymouth, USA
Stromquelle BioRad PowerPac 300 und PowerPac HD	Bio-Rad, München
Thermoblock Dri-Block DB-2A	Techne, Stone, Staffordshire, UK
TissueRuptor	Qiagen, Hilden
Trans-Blot®Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, München
VarioMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Waage MP-3000	Chyo Balance Corp., Komatsu, Japan
Wasserbad GLF und Julabo U3	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zählkammer Neubauer <i>improved</i>	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zentrifugen 5810R, 5415R und 5424	Eppendorf, Hamburg

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller
15ml Falcon™ Röhrchen Polystyrene	Beckton Dickinson/ BD Bioscience, Heidelberg
15ml und 50ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
1ml Einwegsspritze	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn
1ml Feindosierungsspritzen, Omnifix F	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
BD Microlance™ 3 Einwegkanülen 20 G1 ½ " Nr.1 27G ¾ " Nr.20 30G ½ " (Sonderkanüle)	Beckton Dickinson/ BD Bioscience, Heidelberg
Biocoat-Zellkulturplatten, 6-well und 24-well Platte	Beckton Dickinson/ BD Bioscience, Heidelberg
Cellstar 6-well und 24-well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Combitips advanced® Biopure 0,5ml, 5ml, 10ml	Eppendorf, Hamburg
Deckgläserchen	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Einwegskalpelle	Servoprax® GmbH, Wesel
Kryogefäße (2ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
MACS Separation Columns LS	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
Metallsieb, Maschenweite 60 mesh	Sigma-Aldrich-Inc., Saint-Louis, USA
Microvette® 500	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mini-PROTEAN® TGX™ Gels 12% für Mini-PROTEN® Tetra cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multiparameter Messstreifen Leber-Panel für Spotchem EZ VET®	Akay, Kyoto, Japan
Objektträger	Menzel GmbH & CO KG, Braunschweig
Parafilm™	American National Can, Greenwich, CT, USA
PCR-Platten Twin.tec real-time PCR Platte 96 mit Heat Sealing-Film Hard-Shell® Low-Profil Thin-wall 96-well skirted PCR plates mit Microseal® 'B' Adhesive Seals	Eppendorf, Hamburg  Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Petrischale (Zellpräparationen)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (0,1-10µl; 1-20µl; 10-100µl; 101-1000µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (20µl; 200µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
RNase ZapWipes	Ambion/Life technologies, Darmstadt
Safe Lock Reaktionsgefäße (0,5ml; 1ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Serologische Einwegpipetten, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml und 50 ml Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Tissue Ruptor® Disposable probes	Qiagen, Hilden
Trans-Blot® Turbo™ PVDF-Membranen, mini und midi Format	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vakuum Filtrationssystem, 500 ml	Tpp, Schweiz
Vasofix® Safety G22 Sicherheitsvenenverweilkatheter	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Zellkulturflaschen (75cm <sup>3</sup> und 175cm <sup>3</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber, gelb	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellsieb, 100µm, gelb	Beckton Dickinson/ BD Bioscience, Heidelberg

### 2.1.3 Chemikalien

**Tabelle 2.3 Verwendete Chemikalien**

Substanz	Hersteller
10x Tris/Glycin/SDS (TGS) Running Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
2-Propanol (Isopropanol), molecular grade (min. 99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Aqua B.Braun	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA, Paschingen, Österreich
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloroquin	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Ciluprevir (BILN 2061)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Grenzach
D(+)-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DAB-Substrat	Dako, Hamburg
Deoxycholic acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DEPC treated water	Ambion/Life technologies, Darmstadt
DMEM	PAA, Paschingen, Österreich
DMEM/Ham's F12	PAA, Paschingen, Österreich
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
EGTA-Lösung	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt
Ethanol (99,9% p.a.)	Riedel-de-Haën, Seelze
ExGen500 <i>in vitro</i> transfection reagent	Thermo Scientific Fermentas™, St. Leon-Roth
Fetal calf serum (FCS)	PAA, Paschingen, Österreich
GBSS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Geneticin (G418)	PAA, Paschingen, Österreich
Haematoxylin/Eosin-Färbelösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Halt™ Phosphatase Inhibitor	Pierce/ Thermo Fisher Scientific, Bonn
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt
HiPerFect transfection reagent	Qiagen, Hilden
Isofluran, Forene®	Servopharma GmbH, Oberhausen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kalziumchlorid (HCl)	GERBU Biotechnik, Heidelberg
Ketamin 10%	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf
L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Serin, L-Threonin	GERBU Biotechnik, Heidelberg
L-Glutamin (200mM)	PAA, Paschingen, Österreich
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka, Sigma-Aldrich, Burcha, Schweiz
Natriumchlorid (NaCl) 0,9% Infusionslösung	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
NP-40 Nonident® P40 Substitute	Fluka, Sigma-Aldrich, Burcha, Schweiz
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt
Paraformaldehyd-Lösung 4%	Carl-Roth GmbH & CO KG, Karlsruhe
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x), ohne MgCl <sub>2</sub> , ohne CaCl <sub>2</sub> )	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt
Penicilin/Streptomycin	PAA, Paschingen, Österreich
ProLong®Gold antifade reagent without DAPI	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden
RPMI 1640	PAA, Paschingen, Österreich
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Silicon Solution	SERVA Electrophoresis GmbH, München
Tris-base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin-EDTA	PAA, Paschingen, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Xylanzin 2%	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### 2.1.4 Medien und Puffer

Tabelle 2.4 Verwendete Medien und Puffer

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
Ca <sup>2+</sup> -depr. Medium, pH 7,4	L-Asparaginsäure L-Threonin L-Serin Glycin L-Alanin L-Glutaminsäure L-Glutamin D (+)-Glukose Fruktose Sucrose KCl NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O MgCl <sub>2</sub> HEPES NaHCO <sub>3</sub>	0,1mM 0,2mM 0,3mM 0,5mM 0,6mM 0,9mM 0,9mM 20mM 20mM 197mM 3mM 0,7mM 0,5mM 10mM 24mM
Krebs-Ringer-Lösung (500ml), pH 7,4 (sterilfiltriert, ÜN bei 37°C entgast)	NaCl NaHCO <sub>3</sub> Glukose 1 M HEPES Solution C	3,5g 1,0g 1,9g 2,5ml 5ml
MACS Puffer (20min bei 40°C im Ultraschallbad entgast, sterilfiltriert)	BSA EDTA PBS (ohne MgCl <sub>2</sub> , ohne CaCl <sub>2</sub> )	0,5% 2mM Σ 1L
PBS-T (1 Liter)	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Tween 20	8g 0,2g 1,44g 0,24g 1ml
Perfusionslösung 1 für murine PMH	Krebs-Ringer-Lösung 50 mM EGTA	250ml 0,5ml
Perfusionslösung 2 für murine PMH	Krebs-Ringer-Lösung 1 M CaCl <sub>2</sub> Liberase Blendzyme 3	250ml 343µl 23µg/ml
Perfusionslösung für murine KC	Ca <sub>2</sub> -depr. Medium Liberase Blendzyme 3	20ml 7mg/ml
RIPA Lysepuffer (sterilfiltriert)	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl Igepal (NP-40) Deoxycholic Acid Protease Inhibitor Cocktail Halt™ Phosphatase Inhibitor	50mM 150mM 0,5% 0,25% 1 Tablette/10ml 100µl/10ml

Solution C	KCl MgSO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	480mM 120mM 120mM
TBS-T	Tris-HCl NaCl Tween 20	10mM 150mM 0,05% (w/v)
Waschmedium (PMH)	RPMI 1640 FCS aktiv	10%
Zellkulturmedium (con1 & MH1)	DMEM High Glucose FCS hitzeinaktiviert L-Glutamin Pen/Strep G 418	10% 1% 1% 1%
Zellkulturmedium (Hepa1-6, KC, LSEC)	DMEM High Glucose FCS hitzeinaktiviert L-Glutamin Pen/Strep	10% 1% 1%
Zellkulturmedium (PMH)	DMEM/HAM'S F12 FCS aktiv L-Glutamin Pen/Strep	10% 1% 1%
BSA-Blockierungspuffer	BSA in TBS-T oder PBS-T	5%
Magermilch-Blockierungspuffer	BSA in TBS-T oder PBS-T	5%

### 2.1.5 Kits

**Tabelle 2.5 Verwendete Kits**

Bezeichnung	Hersteller
Amersham ECL Plus™ Westernblotting Detection Reagent	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
BCA Protein Assay Kit	Pierce/Thermo Fisher Scientific, Bonn
Histar Detection Kit–Star 3000A	AbD Serotec/Bio-Rad, München
Immunoassay Random Access Systems HBeAg (6C32-20) für das Architect I System	Abbott Diagnostics, Wiesbaden
Opti-Prep	Axis-Shield, Heidelberg
Proteom Profiler: Mouse Cytokine Array Panel A	R&D Systems Europe, Abingdon, UK
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNAlater RNA stabilization reagent	Qiagen, Hilden
RNAprotect animal blood tubes	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy protect animal blood Kit	Qiagen, Hilden

### 2.1.6 Antikörper & Enzyme

**Tabelle 2.6 Verwendete Antikörper & Enzyme**

Bezeichnung	Hersteller
Anti-LSEC MicroBeads mouse; clone ME-9F1	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Liberase Blendzyme 3	Roche, Grenzach
Proteinase K	Dako, Hamburg
Rabbit polyklonal Anti-HBV Core Antigen (HBcAg)	Dako, Hamburg
<b>Western Blot</b>	
Rabbit monoklonal [ERP3708 ] Anti-ACADM AK	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit monoklonal cJun (60A8) AK	Cell signaling/NEB, Frankfurt/Main
Rabbit monoklonal GAPDH (14C10) AK	Cell signaling/NEB, Frankfurt/Main
Rabbit monoklonal NF-κB p65 AK	Cell signaling/NEB, Frankfurt/Main
Rabbit monoklonal phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) AK	Cell signaling/NEB, Frankfurt/Main
Rabbit monoklonal JNK (56G8) AK	Cell signaling/NEB, Frankfurt/Main
Rabbit polyklonal Anti-HBV Core Antigen (HBcAg)	Universität Ulm*
Rabbit polyklonal Anti-HMGCS1 AK	Proteintech™, Manchester, UK
Rabbit polyklonal Anti-HNRPA3 AK	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit polyklonal Anti-PSMA6 AK	Pierce/Thermo Fisher Scientific, Bonn
Rabbit polyklonal Anti-TXNDC5 AK	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit polyklonal hnRNP K (A222) AK	Cell signaling/NEB, Frankfurt/Main
Rabbit polyklonal IDH1 AK	Cell signaling/NEB, Frankfurt/Main
Rabbit polyklonal Isg15 AK	Cell signaling/NEB, Frankfurt/Main
Rabbit polyklonal phospho- NF-κB p65 (Ser536) AK	Cell signaling/NEB, Frankfurt/Main
Rabbit polyklonal phospho-cJun (Ser63) II AK	Cell signaling/NEB, Frankfurt/Main
Goat-anti-rabbit IgG, HRP-linked AK	Cell signaling/NEB, Frankfurt/Main

\* Mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhold Schirmbeck, Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinikum Ulm



## 2.1.7 siRNAs

**Tabelle 2.7** Verwendete siRNAs für die *in vitro* Anwendung

Spezies	Gen	Qiagen Bestell-Nr.
keine	Negative control siRNA (siNC)	102276
human	ISG15	SI00072387
murin	Acadm	SI00887740
	Hmgcs1	SI02746779
	Hnrnp A3	SI01068256
	Hnrnp K	SI01068480
	ldh1	SI01072848
	lsg15	SI01007531
	Psm6	SI02739604
	Txndc5	SI01459304

**Tabelle 2.8** Verwendete siRNAs, synthetisiert von Roche Kulmbach

Name		Sequenz (5' -> 3')	Modifikation
siApoB	Sense antisense	GUCAUCACACUGAAUACCAAU AUUGGUAAUUCAGUGUGAUGACAC	
siApoB-Chol	Sense antisense	GUCAUCACACUGAAUACCAAU AUUGGUAAUUCAGUGUGAUGACAC	Cholesterol
siLuc	Sense antisense	CUUACGCUGAGUACUUCGA UCGAAGUACUCAGCGUAAG	2'O-Methyl
siGal	Sense antisense	CUACACAAAUCAGCGAUUUCCAUGU ACAUGGAAAUCGCUGAUUUUGUGUAG	blunt end 25bp lang
silsg15	Sense antisense	CAGUGAUGCUAGUGGUACA UGUACCACUAGCAUCACUGG	
silsg15-2'O-Methyl	Sense antisense	CAGUGAUGCUAGUGGUACA UGUACCACUAGCAUCACUGG	2'O-Methyl
silsg15-2'Fluor	Sense antisense	CAGUGAUGCUAGUGGUACA UGUACCACUAGCAUCACUGG	2'O-Fluoro
siISG15 (human)	Sense antisense	GGAAAUAAAGGCUGUUGUA UACAACAGCCUUUAUUUCC	2'O-Fluoro
siHBx-8939	Sense antisense	CCGUGUGCACUUCGCUUCA UGAAGCGAAGUGCACACGG	2'O-Methyl
siHBx-9030	Sense antisense	ACCUCUGCCUAAUCAUCUC GAGAUGAUUAGGCAGAGGU	2'O-Methyl
siHBx-8944	Sense antisense	CUGUAGGCAUuAAAUUGGUC GACCAAUUUAUGCCUACAG	2'O-Methyl
siHBV-Pol	Sense antisense	CAAGGUAUGUUGCCCGUUU AAACGGGCAACAUACCUUG	2'O-Methyl

Alle aufgeführten siRNAs, mit Ausnahme der siApoB-Chol, waren für die *in vivo* Anwendung mit Lipidnanopartikeln (LNP01) formuliert. Die Synthese der LNP01 ist in Broering *et al.* 2013 beschrieben.

### 2.1.8 Oligonukleotide

**Tabelle 2.9 Verwendete Oligonukleotide**

Spezies	Gen	Primer (forward)	Primer (reverse)
HBV	HBxAg	F: CCGTCTGTGCCTTCTCATCT	R:TAATCTCCTCCCCCAACTCC
HCV	5' UTR	F: GCGGGTTGATCCAAGAAAGG	R: ATCACTCCCCTGTGAGGAACT
human	$\beta$ -Aktin	F: TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	R: AGCACTGTGTTGGCGTACAG
murine	Gapdh	F: AAATTCAACGGCACAGTCAA	R: TCTCCATGGTGGTGAAGACA
	Ifi-t1	F:CTGAAATGCCAAGTAGCAAGG	R: CCAAAGGCACAGACATAAGGA
	Mx2	F: AACTTCATTGCTGGGGTAGGT	R: TTGATCTGGCGTCCTATGTCT
	$\beta$ -Aktin	F: AAATCGTGCGTGACATCAAA	R: CAAGAAGGAAGGCTGGAAAA

Die Herstellung der Primer wurde bei der Firma Eurofins MWG Operon in Auftrag gegeben (Sequenzangaben in 5'-3'-Orientierung).

**Tabelle 2.10 Verwendete QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen**

Spezies	Gen	Qiagen Bestell-Nr.
human	ACADM	QT00059612
	HMGCS1	QT00055531
	HNRNP A3	QT01032983
	HNRNP K	QT00081424
	IDH1	QT00003983
	ISG15	QT01761886
	PSMA6	QT00069279
	TXNDC5	QT00026838
murin	Acadm	QT00111244
	ApoB	QT01061494
	Asgr1	QT00100520
	CD163	QT00123074
	CD8a	QT02292017
	CD8b	QT00170597
	Clecsf13	QT00103047
	Des	QT00102333
	Emr1	QT00099617
	F7	QT00107223
	Herc5	QT01561364
	Hmgcs1	QT00132461
	Hnrnp A3	QT01779624
	Hnrnp K	QT00165277
	Idh1	QT00103390
	Ifi-t3	QT00292159
	Ifi-tm3	QT01753346
	Ifn- $\alpha$	QT01774353
	Ifn- $\beta$	QT00249662

## Fortsetzung von Tabelle 2.10 Verwendete QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen

Spezies	Gen	Qiagen Bestell-Nr.
murin	Ifn- $\gamma$	QT01038821
	Il-10	QT00106169
	Il-6	QT00098875
	Isg15	QT00322749
	Mcam	QT00159845
	Ncam	QT01065064
	Nos2	QT00100275
	Psma6	QT02250290
	Reln	QT00093569
	RNaseL	QT01066086
	Rsad2	QT00109431
	Tek	QT00114576
	Tnf- $\alpha$	QT00104006
	Txndc5	QT02255757
	Usp18	QT00167671
	$\alpha$ -Sma	QT00140119

## 2.1.9 Plasmide

Tabelle 2.11 Verwendete Plasmide

Plasmid	Hersteller	Referenz
pCAGGS-6His-mlsg15	Addgene #12445	Kim <i>et al.</i> 2004
pCAGEN (pCAGGS <i>backbone</i> )	Addgene #11160	Niwa <i>et al.</i> 1991

## 2.1.10 Proteingrößenstandards

Tabelle 2.12 Verwendete Proteingrößenstandards

Bezeichnung	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific Fermentas™, St. Leon-Roth
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt

### 2.1.11 Zytokine & TLR-Liganden

Tabelle 2.13 Verwendete Zytokine & TLR-Liganden

Bezeichnung	Hersteller
Consensus IFN- $\alpha$ (Inferax)	Astellas Pharma, München
Gardiquimod	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Humanes rekombinantes IFN- $\alpha$ A/D	Life Technologies, Darmstadt
Murines IFN- $\alpha$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
ODN 1826	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Pegasys® (pegyliertes IFN- $\alpha$ 2a)	F. Hoffmann-La Roche, Grenzach
PegIntron® (pegyliertes IFN- $\alpha$ 2b)	Essex Pharma/ MSD, Haar
Polyinosine-polycytidylic acid (PolyI:C), <i>low molecular weight</i>	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Roferon®-A (IFN- $\alpha$ 2a)	F. Hoffmann-La Roche, Grenzach

### 2.1.12 Versuchstiere

Tabelle 2.14 Verwendete Versuchstiere

Wildtyp Mäuse	
C57BL/6	Resistenzgene H-2D <sup>b/b</sup> , Fv-2 <sup>f/s</sup> Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln
Transgene Mäuse	
Tg1,4HBV-s-mut(3)	Halverscheid <i>et al.</i> 2008
MyD88 <sup>-/-</sup>	Adachi <i>et al.</i> 1998
Tlr3 <sup>-/-</sup>	Alexopoulou <i>et al.</i> 2001
Tlr3 <sup>-/-</sup> /Tg1,4HBV-s-mut(3)	Eigene Zucht, Zentrales Tierlabor; Universitätsklinikum Essen

Alle *Knockout* Mäuse hatten den C57BL/6-Hintergrund

Alle Tiere waren zum Versuchsbeginn mindestens 7 Wochen alt. Die Tiere hatten während der Versuche freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“ durchgeführt. Die Mäuse am Uniklinikum Essen wurden unter tierärztlicher Kontrolle gezüchtet.

### 2.1.13 Hepatomzelllinien

Die con1 Zelllinie ist ein Derivat der humanen Hepatomzelllinie HuH-7 und enthält das subgenomische und bicistronische HCV-Replikon I377/NS3-3', das auf dem Genotyp 1b basiert (Lohmann *et al.* 1999). Die MH1 Zelllinie ist ein Derivat der murinen Hepatomzelllinie Hepa1-6 und enthält das subgenomische und bicistronische HCV-Replikon I377/NS3-3', das auf dem Genotyp 1b Stamm con1 basiert (Zhu *et al.* 2003).

**Tabelle 2.15 Verwendete Hepatomzelllinien**

Name	Organismus	Referenz
Hepa1-6	<i>Mus musculus</i>	ATCC Nr. CRL-1830 <sup>TM</sup>
MH1	<i>Mus musculus</i>	Zhu <i>et al.</i> 2003
Con1	<i>Homo sapiens</i>	Genbank Accession No. AJ242652 (Lohmann <i>et al.</i> 1999)

### 2.1.14 Software

**Tabelle 2.16 Verwendete Software**

Program	Verwendung
Axiovision Zeiss 4.0	Mikroskop Software
Bio-Rad CFX Manager	Auswertung der qRT-PCR
GraphPad PRISM 4.0 und 5.0	Graphische Darstellung der Ergebnisse
Mastercycler® ep realplex software (Eppendorf)	Auswertung der qRT-PCR
MS-Office 2010	Bearbeitung und Darstellung dieser Arbeit
Phoretics 1D 4.01	Optische Auswertung der Zytokin Arrays
Vilber Lourmat Fusion software	Optische Auswertung der Western Blot Membranen
Zotero 9.0.1	Literaturarchiv

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM High Glucose [4,5 m/l]) kultiviert, das folgende Zusätze enthielt: 10% fötales Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin. Das Medium für die Replikon enthaltenden Zellen war zusätzlich mit dem Selektionsantibiotikum Geneticin (G418-Sulfat) in der Konzentration 500 µg/ml Medium versetzt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gespült und mit Trypsin-EDTA überschichtet, nach dem Ablösen der Zellen wurden diese erneut in Kulturmedium aufgenommen und in einer 1:5 Verdünnung erneut in Kultur genommen. Sämtliche Arbeiten mit den Zellen wurden unter der Sterilwerkbank bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.2.2 Isolation primärer muriner Hepatozyten (PMH)

Die Isolation von Hepatozyten erfolgte standardgemäß aus 7-9 Wochen alten, männlichen C57BL/6 Mäusen. Alle während der Isolation verwendeten gläsernen Behältnisse sind zuvor mit Silikon beschichtet, über Nacht getrocknet und autoklaviert worden. Die Mäuse wurden initial durch interperitoneale Gabe von 0,25ml eines Ketamin/Xylanzin Gemisches (1,6%/0,3% in 0,9% NaCl) betäubt. Anschließend wurden die Tiere auf dem OP-Tisch fixiert und die Leber freigelegt. Die *Vena cava inferior* wurde proximal der Nierenvene mit einer Braunüle (Vasofix® Safety 22G) punktiert, die Pfortader wurde durchtrennt und die Maus mit insgesamt 50ml (7ml/min) der Perfusionslösung 1 perfundiert. Die optimale Perfusion ließ sich an der Entfärbung der Leber erkennen. Es wurde das Zwerchfell durchtrennt und die *Vena cava anterior* ligiert. Dies führt zu einem Rückstau der Perfusionslösung in der Leber. Der Perfusionslösung 1 schloss sich eine weitere Perfusion mit 50ml (7ml/min) der Perfusionslösung 2 an. Die Maus wurde anschließend durch einen Herzschnitt getötet, die Leber entnommen und fortlaufend auf Eis (4°C) gelagert. Das zu diesem Zeitpunkt bereits gut verdaute Gewebe wurde ausgestrichen und durch ein 100µm Nylon Sieb filtriert. Die Zellen werden in kaltem Waschmedium aufgenommen und in 3 Waschschritten bei 20g und 4°C pelletiert. Der Überstand nach Waschschrift 1 wurde verwendet, um zusätzlich einen Mix aus NPC zu isolieren

(siehe 2.2.3). Nach einer Zellzahlbestimmung werden  $3 \times 10^5$  bzw.  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung einer kollagenisierten 24- oder 6-Lochplatte in jeweils 0,5ml bzw. 2ml Medium ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde 24h nach der Präparation erneuert und die Zellen erst 48h nach Präparation für weitere Versuche verwendet.

### **2.2.3 Isolation eines NPC Mix aus dem Hepatozyten Überstand**

Für die Isolation von KC oder LSEC wurden für ein Experiment jeweils 10 gleichbehandelte Mäuse benötigt. Um Materialkosten (siRNA) zu sparen und die Versuchstierzahlen möglichst gering zu halten, wurde dieses kurze Protokoll entwickelt, um einen Mix der nicht-parenchymalen Leberzellen (NPC) aus dem Überstand der Hepatozyten Präparation (2.2.2) zu gewinnen. Dieser Überstand wurde in mehreren Schritten so lange bei geringer Geschwindigkeit zentrifugiert, bis kein Pellet aus Hepatozyten mehr vorhanden war. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein frisches 50ml Röhrchen überführt. Die in der Suspension verbleibenden NPC wurden nun bei 500g für 10min pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und danach für eine anschließende RNA Isolation direkt in 3ml Qiazol lysiert. Die Reinheit der Zellen wurde routinemäßig mittels qRT-PCR durch den Nachweis von zellspezifischen Markergenen analysiert.

### **2.2.4 Isolation von Kupffer Zellen (KC) oder sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC)**

Zur Präparation der murinen KC oder LSEC wurden 7-9 Wochen alte C57BL/6 Mäuse verwendet. Die Leber der Tiere wurde nach Tötung durch Genickbruch freigelegt und mittels einer Pumpe (MasterFlex, Cole-Parmer Instrument Company) mit 10ml eines Ca<sup>2+</sup>-freien Puffers (Ca<sup>2+</sup>-depr. Medium) über eine 0,4mm Kanüle via Pfortader blutfrei perfundiert (4ml/min) und anschließend mit 10ml 0,07mg/ml Liberase Blendzyme3 in Ca<sup>2+</sup>-haltiger *Gey's balanced salt solution* (GBSS) gespült (4ml/min), eine Kollagenase-Lösung, die die Bindegewebsstrukturen verdaut und die Präparation einzelner Zellen ermöglicht. Die Leber wurde anschließend entnommen und in 30ml GBSS mit 0,07mg/ml Liberase Blendzyme3 aufgenommen, mechanisch

zerkleinert und für 30min bei 37°C und einer Rotation von 240rpm (Inkubator Innova 400) enzymatisch verdaut. Die entstandene Zellsuspension wurde dann über ein Sieb (60µm Maschenweite) gegeben, um unverdautes Gewebe zu entfernen. Es wurden zusätzliche 130ml GBSS über die Gewebereste im Sieb gegeben und mit einem Mörser durch das Sieb gepresst. Die Zellsuspension wurde in einem Messbecher aufgefangen. Alle gläsernen Behälter, die während der Zellpräparation verwendet wurden, sind zuvor mit Silikon beschichtet, über Nacht getrocknet und autoklaviert worden. Anschließend wurde die Suspension in vier 50ml Polystyren-Röhrchen überführt und bei 300g für 10min bei 20°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in zwei Waschschritten in GBSS resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Im letzten Waschschriff wurden die Zellen in einem Reaktionsgefäß vereinigt und anschließend in GBSS resuspendiert.

Zur Aufreinigung der NPC wurden die Zellen nach dem Waschen in 30ml GBSS resuspendiert und eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierzu wurde OptiPrep bis zu einem Iodixanol Gehalt von 40% mit GBSS verdünnt und davon jeweils 4,25ml in 15ml Polystyren Röhrchen vorgelegt. Es wurden 5,75ml der Zellsuspension dazugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Suspension mit 2ml GBSS überschichtet, um ein Austrocknen der Zellen während der Zentrifugation zu verhindern. Zentrifugiert wurde der Gradient bei 400g für 15min bei 20°C, wobei sowohl die Beschleunigung der Zentrifuge reduziert (von 9 auf 5) und die Bremse deaktiviert wurden. Die entstandene Zellschicht in den Röhrchen wurde heraus pipettiert, in ein 50ml-Röhrchen überführt und mit GBSS aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 300g für 10min und 20°C pelletiert, für zwei weitere Waschschriffe in GBSS aufgenommen und erneut zentrifugiert, um die Gradientenlösung zu entfernen, die die anschließende Elutration behindern würde. Das Pellet wurde dann in 6ml GBSS aufgenommen. Von diesem Punkt an weichen die Protokolle zur Isolation von LSEC und KC voneinander ab.

Die LSEC wurden mittels anti-LSEC-Antikörpern beschichteten, magnetischen MACS *MicroBeads* aus der Zellsuspension isoliert. Die durch Antikörper vermittelte Isolation der LSEC über den endothelspezifischen Antikörper ME-9F1 (Harder *et al.* 1991) ermöglicht die Präparation einer LSEC Population mit einer Reinheit von  $\geq 95\%$  (Diehl *et al.* 2008; Schrage *et al.* 2008).



Die in GBSS gelösten KC wurden mittels Elutriation aufgereinigt. Bei der Elutriation handelt es sich um einen Zentrifugationsvorgang mit einem gleichzeitig entgegengesetzten, kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom. Die Zentrifugalkräfte der Rotation führen zu einer Sedimentation der Zellen, der Flüssigkeitsstrom wirkt als Zentripetalkraft in entgegengesetzter Richtung. Jede Zelle ordnet sich in der Separationskammer in einer Zone an, in der auf die Zelle ein Gleichgewicht der Kräfte herrscht. Die Zellen trennen sich so nach Größe und Dichte auf und werden durch die spezielle Konstruktion der Separationskammer in einem Fließgleichgewicht gehalten. Durch die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums können so relativ homogene Zellfraktionen gewonnen werden.

Der Elutriator (Avanti™ Zentrifuge J-25, Beckmann) wurde entsprechend den Herstelleranweisungen aufgebaut und mit PBS, 75%-igem unvergälltem Ethanol und erneut mit PBS gespült, wobei darauf geachtet werden musste, die Entstehung von Luftblasen im System zu vermeiden. Anschließend wurde GBSS an die Pumpe angeschlossen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 16ml/min durch den Elutriator gepumpt. Nun wurde die aufzutrennende Zellsuspension über eine 0,9mm Kanüle in das Schlauchsystem überführt. Anschließend wurden 100ml des Durchlaufs fraktioniert und die Fließgeschwindigkeit schrittweise auf 23ml/min, 32ml/min und schließlich auf 56ml/min erhöht und jedes Mal wurden ca. 100ml der durchgelaufenen Flüssigkeit fraktioniert. Die Kupfferzellen befanden sich nun in der 56ml/min-Durchlauf-Fraktion. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 300g für 10min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in dem entsprechenden Zellkulturmedium resuspendiert.

Die Zellzahlen der KC oder LSEC wurden anhand der Neugebauer-Zählkammer bestimmt und  $3 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer kollagenisierten 24-Lochplatte in jeweils 0,5ml Medium ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde nach 24h entfernt, die Zellen einmal mit Medium überspült und erneut in 0,5ml Medium aufgenommen und weitere 24h bis zum Experiment wie zuvor beschrieben kultiviert.

## 2.2.5 *In vitro* Stimulation

### 2.2.5.1 Verwendung von siRNAs *in vitro*

Die Suppression der Genexpression mittels siRNA, auch *Gen-Knockdown* genannt, erfolgt über einen zellulären Mechanismus. Die Degradation der, zum *antisense* Strang der siRNA, komplementären mRNA führt zu einer Reduktion der Translation dieser mRNAs und somit zu einem *gene silencing* auf posttranskriptioneller Ebene (Hammond *et al.* 2000). Es ist zu erwarten, dass die doppelsträngigen, heterologen siRNAs in immunkompetenten Zellen eine Immunantwort auslösen. Es wurde nicht nur die *Knockdown* Effizienz der verschiedenen siRNAs und deren Effekt auf die HCV-Replikation untersucht, sondern auch deren immunstimulatorisches Potenzial.

Alle Arbeiten fanden unter der Sterilwerkbank statt. Die beschriebenen Hepatomzelllinien (Hepa1-6, MH1 und con1) sowie primäre murine Hepatozyten (PMH), Kupffer Zellen (KC) und sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) wurden im 24er Lochplattenformat, mit ausgewählten siRNAs transfiziert. Die Auswirkungen auf die Genexpression verschiedener Gene, sowie auf die HCV-Replikation in den Linien con1 und MH1, wurden untersucht. Als Kontrolle wurde eine nicht-kodogene siRNA (*negative control*, siNC) eingesetzt. Die Hepatomzellen wurden 24h vor Transfektion in die 24er Lochplatten gesät, die primären murinen Leberzellen wurden 48h nach Präparation verwendet.

Eine zusätzliche Behandlung mit Chloroquin erfolgte in entsprechenden Experimenten vor der Transfektion. Die Zellen wurden mit 100µl Medium und einer finalen Chloroquin-Konzentration von 100µM 30min im Brutschrank inkubiert.

Vor der Transfektion erfolgte immer ein Wechsel des Zellkulturmediums (0,5ml/Vertiefung). Es wurde das Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen) verwendet. Die verwendeten siRNAs sind den Tabellen 2.7 und 2.8 zu entnehmen. Der Transfektionsansatz (siehe Tabelle 2.17) wurde nun 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 100µl in jede Lochplattenvertiefung pipettiert. Die KC bildeten eine Ausnahme, da sie kein zusätzliches Medium erhielten. Erst 6h nach Transfektion wurden die Lochvertiefungen auf 0,5ml mit dem entsprechenden Medium aufgefüllt. Bei den Hepatomzelllinien erfolgte ein Mediumwechsel 8h nach der Transfektion. Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Nach 24h bzw. 72h wurde die RNA bzw. die Proteine

extrahiert und der Rückgang der ausgeschalteten Gene, die HCV-Replikation (con1 und MH1), sowie Gene des Immunsystems mittels quantitativer RT-PCR bzw. Western Blot untersucht.

**Tabelle 2.17 Zusammensetzung der Transfektionsansätze**

	<b>Zelllinie</b>	<b>PMH</b>	<b>KC</b>	<b>LSEC</b>
<b>Finale Konzentration der siRNA</b>	5-10nM	50nM	25nM	25nM
<b>Serum freies Medium</b>	100µl	100µl	100µl	100µl
<b>HiPerFect</b>	3µl	3µl	6µl	3µl
<b>Mediumwechsel nach Transfektion</b>	8h	-	Nach 6h mit Medium auffüllen	-
<b>Zell-Ernte nach</b>	24h bis 72h	24h	24h	24h

### 2.2.5.2 ISG15 *Knockdown* kombiniert mit einem Protease-Inhibitor in HCV-Replikon Zellen

Die humanen subgenomischen HCV-Replikon Zellen con1 wurden wie unter 2.2.1 beschrieben kultiviert. Um die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) des Protease-Inhibitors BILN2061 (Ciluprevir) zu ermitteln, wurde dieser in unterschiedlichen Konzentrationen (0,05 – 5nM) dem Kulturmedium zugesetzt und die Zellen für weitere 72h inkubiert. Nach der RNA Isolation erfolgte eine Analyse der Suppression der HCV-Replikation mittels qRT-PCR.

Die con1 Zellen wurden mit den siRNAs siISG15 und siNC transfiziert (2.2.5.1) und zusätzlich mit BILN2061 in der  $IC_{50}$  behandelt. Für die Langzeitbehandlung über 3 Wochen wurden die con1 nach jeder Passage erneut transfiziert und über den gesamten Zeitraum mit BILN2061 in der  $IC_{50}$  inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte 8h nach Transfektion wiederum mit BILN2061, in der  $IC_{50}$  Dosierung. Nach jeder Passage wurden Zellen für die RNA Isolation zurück behalten und die Expression von HCV-RNA wurde mittels qRT-PCR bestimmt.

### 2.2.5.3 Stimulation von PMH mit Interferonen

Um ein geeignetes IFN- $\alpha$  für den *in vivo* Einsatz in der Maus zu finden, wurden verschiedene therapeutisch genutzte IFN- $\alpha$  Präparate zunächst *in vitro* getestet, als Kontrolle diente murines IFN- $\alpha$  (Tabelle 2.13). Nach der Präparation von primären murinen Hepatozyten wurden diese in 0,5ml Medium pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausgesät und für 48h, wie in Absatz 2.2.2 beschrieben, inkubiert, wobei nach 24h ein Mediumwechsel erfolgte. Das IFN- $\alpha$  wurde nach 2 Tagen im Rahmen eines Mediumwechsels in einer Konzentration von 10.000 IU/ml Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 6h mit den Interferonen inkubiert, die RNA extrahiert und über quantitative RT-PCR die ISG Induktion beobachtet.

### 2.2.5.4 Überexpression von Isg15 in HCV-Replikon Zellen

Alle nachstehenden Arbeiten fanden unter der Sterilwerkbank statt. Die Hepatom-Zelllinie MH1 wurde in die 24er Lochplatten gesät und 24h später mit dem Plasmid pCAGGS-6His-mIsg15 (pIsg15) transfiziert. Als Leervektor-Kontrolle (LV) wurde der Vektor pCAGEN eingesetzt. Direkt vor der Transfektion erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Es wurde das ExGene500 Transfektionsreagenz nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Transfektionansatz (100 $\mu$ l NaCl, 1 $\mu$ g Plasmid-DNA, 5 $\mu$ l ExGene500) wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 100 $\mu$ l in jede Lochplattenvertiefung pipettiert. Es erfolgte ein Mediumwechsel 8h nach der Transfektion. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank für 24h bis 72h inkubiert. Danach wurde die RNA bzw. Gesamtprotein extrahiert und die Auswirkung der Isg15-Überexpression auf die Genexpression verschiedener Gene, sowie auf die HCV-Replikation mittels quantitativer RT-PCR bzw. Western Blot untersucht.

## 2.2.6 *In vivo* Applikationen

### 2.2.6.1 Applikation der LNP01 formulierten siRNA *in vivo*

Es wurden 7-9 Wochen alte, männliche Mäuse folgender Stämmen für die siRNA Injektionen verwendet: C57BL/6, MyD88<sup>-/-</sup>, TLR3<sup>-/-</sup> und Tg1.4HBV-s-mut(3). Die Tiere besaßen ein Durchschnittsgewicht von 25g. Die verwendete LNP01 formulierten

siRNAs wurde von Roche Kulmbach zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen und Modifikationen können der Tabelle 2.8 entnommen werden. Die siRNAs wurde unter der Sterilwerkbank mittels Spritze und Kanüle entnommen und mit PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Es wurden Sonderkanülen (30G½) für die Injektion in die Schwanzvene verwendet. Zur Applikation wurde der IK-M Impfkäfig für Mäuse von der Firma EBECO GmbH verwendet. Um die Blutgefäße der Mäuse zu erweitern, wurde der Käfig zuvor mit Infrarotlicht bestrahlt und der Schwanz direkt vor Applikation in warmes Wasser gehalten. Zur Hautdesinfektion vor Injektion wurde Cutasept® F verwendet. Die siRNA wurde mit einer Konzentration von 4µg pro Gramm Körpergewicht in einem Volumen von 200µl in die Schwanzvene appliziert. Kontrolltieren wurde 200µl PBS i.v. verabreicht. Die Analyse erfolgte 6, 24, 48, 72, 96 Stunden oder 10 Tage nach Injektion.

#### **2.2.6.2 Applikation von TLR-Liganden und IFN-α *in vivo***

Es wurden 7-9 Wochen alte, männliche Mäuse der Stämmen C57BL/6 oder Tg1.4HBV-s-mut(3) für die Injektionen verwendet. Die i.v. Applikation der TLR-Liganden bzw. von IFN-α erfolgte, wie zuvor beschrieben (2.2.6.1). Die Liganden von TLR3 (PolyI:C), -7 (Gardiquimod) und -9 (ODN 1826) wurden mit einer Konzentration von 4µg pro Gramm Körpergewicht bzw. das Consensus IFN-α (Inferax) mit 600 IU/g Körpergewicht, in einem Volumen von 200µl in die Schwanzvene appliziert. Den Kontrolltieren wurde 200µl PBS i.v. verabreicht. Während die Tg1.4HBV-s-mut(3) Mäusen jeweils einen TLR-Liganden appliziert bekamen, wurden die C57BL/6 Mäuse auch mit verschiedenen Kombinationen aus siRNA plus PolyI:C oder siRNA plus IFN-α behandelt. PolyI:C wurde 3h nach siLuc oder siGal appliziert, und 48h nach silsg15. Die Gabe von IFN-α erfolgte 10 Tage nach der silsg15 Injektion. Die Analyse erfolgte jeweils 6h nach der letzten Injektion.

#### **2.2.6.3 Probengewinnung aus den Versuchstieren**

Die Tötung der Mäuse erfolgte 6, 24, 48, 72, 96 Stunden oder 10 Tage nach Injektion von siRNA, TLR-Liganden oder Inferax. Es wurden jeweils 2x2x2mm große Proben folgender Organe entnommen: linker Leberlappen, Niere, Herz und Milz sowie 200-

400µl Blut. Die Blutentnahme erfolgte unter Isoflurannarkose mittels Orbitalpunktion, an welche sich die Tötung mittels zervikaler Dislokation anschloss. Die Gewebeproben wurden direkt in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert oder in RNAlater der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers konserviert. Das Blut wurde in 100µl RNeasy protect animal blood tubes (Qiagen) aufgenommen und die RNA mittels RNeasy protect animal blood Kit (Qiagen) isoliert. Alternativ wurde das Blut in 1,5ml Reaktionsgefäßen aufgefangen, einige Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und 10min bei 3.000g zentrifugiert. Das Serum wurde in ein frisches Gefäß überführt und bei -80°C gelagert. Der mittlere Leberlappen wurde zur späteren immunhistologischen Färbung in 4,5% Paraformaldehyd fixiert.

Alternativ dazu erfolgte die Präparation von PMH (2.2.2) und einem Mix aus NPC (2.2.3) aus der einzelnen Maus. Der Mix aus NPC wurde direkt nach der Präparation in Qiazol bzw. RIPA-Lysepuffer aufgenommen. Die PMH wurden noch 1h in einer 6-Lochplatte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert, einmal mit PBS überspült und danach in Qiazol oder RIPA-Lysepuffer lysiert. Es folgte die RNA Isolierung oder die Extraktion der Proteine.

### **2.2.7 Isolierung von totaler RNA aus Zellkultur oder Geweben**

Zur Extraktion der totalen RNA wurden die Zellen mit 0,5ml/24-Lochplatte bzw. 1ml/6-Lochplatte, Qiazol überschichtet und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Zur RNA Extraktion aus murinen Organen wurde ein 2x2x2 mm großer Gewebeblock in 2ml Qiazol mit dem TissueRuptor (Qiagen) zerkleinert und auf zwei Reaktionsgefäße a 1ml aufgeteilt.

Es wurden 0,2ml Chloroform/ 1ml Qiazol dazu gegeben und durch Schütteln vermischt. Das Zentrifugieren für 15min bei 12.000g und 4°C führte zur Phasentrennung des Phenol-Chloroform-Gemisches. Die wässrige, obere Phase wurde abgenommen und die gelöste RNA durch Zugabe von 0,5ml Isopropanol/1ml Qiazol gefällt. Das RNA-Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und abschließend in RNase freiem Wasser gelöst. Im Anschluss wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) entsprechend den Herstelleranweisungen aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.8 Quantitative *realtime* PCR

Die reverse Transkription (RT) von RNA, gefolgt von einer Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR), ist eine extrem sensitive Methode, zur Quantifizierung spezifischer mRNAs. In einem *one-step* Verfahren wird durch den Einsatz spezifischer Primer zuerst die mRNA des gesuchten Gens in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche wiederum als Matrize für die folgende PCR dient. Um eine quantitative Aussage über die eingesetzte Menge an mRNA machen zu können, wurde der *Mastercycler ep realplex* der Firma Eppendorf und das *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* von Bio Rad verwendet. In den Detektionskanälen der Geräte wird das Fluorophor SYBR Green mit 492nm angeregt und die Intensität der Emissionsfluoreszenz (521nm) quantifiziert. Bindet SYBR Green an dsDNA, wird die Fluoreszenz verstärkt. Die Auswertung erfolgte über die jeweiligen Programme: *Mastercycler® ep realplex software* (Eppendorf) oder Bio-Rad CFX Manager. Eingesetzt wurde das QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit von Qiagen, ein 15µl Ansatz wurde wie folgt hergestellt: 2,4 µl H<sub>2</sub>O (RNase frei), 7,5 µl QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0,14 µl QuantiFast RT-Mix, 1,5 µl jedes Primers (0,5 mM) und 2 µl Gesamt-RNA (100ng-200ng). Das verwendete PCR-Programm ist in der Tabelle 2.18 dargestellt:

**Tabelle 2.18 qRT-PCR Programm**

	Temperatur	Dauer	Schritt
1	50°C	∞	Vorheizen; die Deckeltemperatur beträgt 105°C
	Start		
2	50°C	10min	Reverse Transkription (mRNA wird in cDNA umgeschrieben)
3	95°C	5min	Initialisierung: die HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase wird aktiviert
4	95°C	10sek	Denaturierung
5	60°C	30sek	Kombinierte Primerhybridisierung & Elongation
6	Fluoreszenzmessung		
7	Gehe zu Schritt 4, 39x		
8	65°C		Schmelzkurven-Determinierung

Die PCR-Produktbildung wurde nach jedem Replikationszyklus über den Fluoreszenz Anstieg bestimmt. Nach 40 Replikationszyklen wurden die Schmelzkurven der gebildeten Produkte erfasst, um die Spezifität der PCR-Reaktion zu überprüfen.

Aufgrund seiner spezifischen DNA-Sequenz besitzt jedes entstandene PCR-Produkt eine individuelle Schmelztemperatur. Diese wird über die Fluoreszenzänderung in einem Temperaturgradienten vom PCR-Cycler ermittelt. Die Schmelzkurve gibt Aufschluss über die Spezifität einer PCR-Reaktion. Ist nur ein Maximum in der Schmelzkurve vorhanden, ist auch nur ein spezifisches PCR-Produkt entstanden. Die vom PCR-Cycler kalkulierten Kopienzahlen der gemessenen Gene wurden gegen die *housekeeping* Gene  $\beta$ -Aktin (*in vitro*) oder Gapdh (*in vivo*) abgeglichen und analysiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind den Tabellen 2.9 und 2.10 zu entnehmen, alle verfügen über eine Primerhybridisierungstemperatur von 55°C.

## **2.2.9 Nachweis von Proteinen**

### **2.2.9.1 Extraktion von Proteinen**

Zur Proteinextraktion wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt. Die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit 4°C kaltem RIPA-Lysepuffer (75µl pro Vertiefung einer 24-Lochplatte) überschichtet und für 20min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Schaber von der Platte gelöst und die Zellsuspension in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Um restliche Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Zelllysate für 6min bei 2000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die nukleären und zytoplasmatischen Proteine und wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Proteine wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Isolation von Proteinen aus murinem Gewebe erfolgte aus einem 2x2x2mm großen Gewebeblock, welcher in 0,7ml RIPA-Lysepuffer mithilfe des TissueRuptors (Qiagen) homogenisiert wurde. Das Lysat wurde für 30min auf Eis inkubiert und anschließend 30min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Konzentration der Protein-Lösung wurde anhand des Pierce BCA Protein Assay Kit entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 560nm. Eine BSA-Eichkurve wurde als Standard verwendet.



### **2.2.9.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine können, unter denaturierenden Bedingungen, in Polyacrylamidgelen ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die eigene Polarität der Proteine, gegeben durch die verschiedenen, geladenen Aminosäurereste, wird durch Natriumdodecylsulfat (SDS) im Probenpuffer überdeckt. Dieses anionische Detergenz lagert sich unabhängig von der Aminosäuresequenz an die Proteine. Aufgrund dieser negativen Ladung wandern alle Proteine zur Anode. Es wurden 30µg der Proteinproben mit SDS-Probenpuffer (NuPAGE Invitrogen plus β-Mercaptoethanol) versetzt und für 5 min bei 96°C denaturiert. Die Taschen des Mini-PROTEAN TGX precast Gels (Bio-Rad) wurden mit Laufpuffer (1x Tris-Glycin-SDS (TGS) Puffer, Bio-Rad) gespült und mit den Proben sowie Größenstandards (PagerRuler und MagicMark) beladen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 200V für 30min im Mini-PROTEAN® Tetra cell System der Firma Bio-Rad durchgeführt.

### **2.2.9.3 Western Blot**

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrobplot aus dem Gel auf eine PVDF-Membran überführt. Dieser Proteintransfer erfolgte als „semi-dry“ Blot mit dem TransBlot®Turbo™-System von Bio-Rad. In die Transferkammer wurden vier in Puffer getränkte Filter und die PVDF-Membran luftblasenfrei gelegt (Trans-Blot® Turbo™ Midi oder Mini PVDF Transfer Kit). Das Trenngel wurde auf die Membran gelegt und dann mit vier weiteren in Puffer getränkten Filtern bedeckt. Mit einer Rolle wurden evtl. noch vorhandene Luftblasen entfernt, der Deckel aufgebracht und mit leichtem Druck verschlossen. Der Transfer erfolgt bei Mini Gelen für 3min, bei Midi Gelen für 7min. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1-2h bei Raumtemperatur in Magermilch- oder BSA-Blockierungspuffer geschwenkt. Dies diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Die primären Antikörper zur Detektion ausgewählter Proteine wurden, entsprechend der tabellarisch dargestellten Verdünnung (Tabelle 2.19), in Blockierungspuffer angesetzt und über Nacht bei 4°C schwenkend, inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10min mit PBS-T bzw. TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte 1h bei Raumtemperatur, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS-T bzw. TBS-T für 10min. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Amersham ECL™ Westernblotting Detection Reagent nach Angaben des Herstellers.

Die Visualisierung und Quantifizierung erfolgte mit der Fusion Fx7-*advanced* (Vilber Lourmat) und der entsprechenden Software.

**Tabelle 2.19 Western Blot Antikörper und ihre Verdünnungen**

Bezeichnung	Verdünnung
Rabbit monoklonal [ERP3708 ] Anti-ACADM AK	1:1000
Rabbit monoklonal cJun (60A8) AK	1:1000
Rabbit monoklonal GAPDH (14C10) AK	1:5000
Rabbit monoklonal NF-κB p65 AK	1:1000
Rabbit monoklonal phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) AK	1:1000
Rabbit monoklonal JNK (56G8) AK	1:1000
Rabbit polyklonal Anti-HBV Core Antigen (HBcAg)	1:1000
Rabbit polyklonal Anti-HMGCS1 AK	1:1000
Rabbit polyklonal Anti-HNRPA3 AK	1:200
Rabbit polyklonal Anti-PSMA6 AK	1:1000
Rabbit polyklonal Anti-TXNDC5 AK	1:1000
Rabbit polyklonal hnRNP K (A222) AK	1:500
Rabbit polyklonal IDH1 AK	1:500
Rabbit polyklonal Isg15 AK	1:1000
Rabbit polyklonal phospho- NF-κB p65 (Ser536) AK	1:1000
Rabbit polyklonal phospho-cJun (Ser63) II AK	1:1000
Goat-anti-rabbit IgG, HRP-linked AK	1:10000

#### 2.2.9.4 Immunhistologische Färbungen

Die Einbettung der murinen Lebern in Paraffin, die Anfertigung der Paraffinschnitte sowie die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde freundlicherweise von Frau Dorothe Möllmann am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

Das Gewebe (mittlerer Leberlappen) wurde mindestens 24h bis zu einer Woche in 4,5% Paraformaldehyd gelagert, welches bei Bedarf gewechselt wurde. Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in ein Xylolbad gegeben und in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden mit dem Schlittenmikrotom ca. 1-3µm starke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht.

#### *2.2.9.4.1 HE Färbung*

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE Färbung) ist eine Routinefärbung, welche verschiedene Strukturen im (Leber-) Gewebe anfärbt. Alle basophilen Strukturen (z.B. Zellkern/DNA und Ribosomen) werden blau gefärbt. Alle azidophilen Strukturen (z.B. Zytoplasmaproteine und Mitochondrien) nehmen eine rote Färbung an.

Die Entparaffinisierung der Schnitte erfolgte vor der Färbung mittels Xylolbad, die Rehydrierung durch eine absteigende Ethanolreihe. Die Gewebeschnitte wurden dann in Hämalaun-Lösung inkubiert, mit Wasser gespült und in einer Eosin-Lösung inkubiert. Nach erneuter Wasser-Spülung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe wieder dehydriert und abschließend in Histomount eingedeckt. Diese Färbung wurde freundlicherweise von der Pathologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

#### *2.2.9.4.2 Immunhistologische Färbung von HBcAg in murinen Lebern*

Die Lebern der 1,4HBV-s-mut(3) transgenen Mäuse wurden wie oben beschrieben in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die Entparaffinisierung der Schnitte erfolgte vor der Färbung mittels Xylolbad, die Rehydrierung durch eine absteigende Ethanolreihe. Die Permeabilisierung wurde durch Triton X-100 erreicht. Um das, bei der Fixierung maskierte, Epitop für den Antikörper wieder frei zugänglich zu machen, folgte die enzymatische Behandlung mit Proteinase K. Die weitere Färbung wurde mit Hilfe des Histar Detection Kit 3000A der Firma AbD Serotec nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die viralen Strukturen im Lebergewebe nachzuweisen, wurde der Rabbit polyklonale Anti-HBV Core Antigen (HBcAg)-Antikörper der Firma Dako in der Verdünnung 1:700 verwendet. Zum Eindecken der Schnitte wurde das ProLong® Gold Antifade Reagent ohne DAPI verwendet.

#### **2.2.9.5 Bestimmung von Serumparametern**

Die murinen Serumparameter wurden mit dem Spotchem™-System analysiert. Für diesen Trockenchemie-Analyser genügt ein Multiparameter Messstreifen um AST, ALT, LDH, Bilirubin, Gesamtprotein und Albumin zu bestimmen. Der Reagenzstreifen besitzt ein mehrschichtiges Testfeld, bestehend aus den nötigen Substanzen, um eine Farbreaktion hervorzurufen. Diese wird durch Reflexionsspektroskopie vom SPOTCHEM™-Analysegerät der Firma Akray quantifiziert.

#### **2.2.9.6 Zytokin Nachweis im Serum (Zytokin Array)**

Zur Analyse verschiedener Zytokine im Serum wurde das *Proteome Profiler™ Mouse Cytokine Array Panel A* Kit verwendet. Es wurden je 50µl Serum (2.4.3) von drei gleich behandelten Mäusen vereint und für die Analyse, nach Herstellerangaben, verwendet. Die Visualisierung und Quantifizierung erfolgte mit dem Gerät Fusion Fx7-advanced (Vilber Lourmat) und der entsprechenden Software.

#### **2.2.9.7 HBeAg Nachweis im Serum**

Der Nachweis des HBeAg im Serum der 1,4HBV-s-mut(3) transgenen Mäuse wurde freundlicherweise von Fr. Thekla Kemper in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mengji Lu, am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Essen, durchgeführt. Es wurde das Immunoassay Random Access Systems HBeAg Kit sowie der Immunoassay-Analyzer Architect der Firma Abbott Diagnostics (Wiesbaden) verwendet.

#### **2.2.10 Nachweis der HBV-DNA mittels Southern Blot**

Freundlicherweise wurde auch der Nachweis der HBV-DNA mittels Southern Blot im Institut für Virologie des Universitätsklinikums Essen, von Fr. Thekla Kemper (AG Prof. Dr. Mengji Lu) durchgeführt. Die DNA wurde aus 2x2x2mm großen Leberblöcken mit Hilfe des QIAamp DNA mini Kits (Qiagen) isoliert und der Southern Blot, wie in der folgenden Literatur beschrieben, durchgeführt (Xia *et al.* 2008; Meng *et al.* 2009).

### 2.2.11 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM (*standard error of mean*) angegeben. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels Wilcoxon Test oder der ANOVA Analyse berechnet. Waren die Varianzen zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich, wurde die Welch's-Korrektur angewendet. Ab einem Wert von  $p < 0.05$  wurden die Daten als statistisch signifikant gewertet. Für die genannten Berechnungen, sowie die graphische Darstellung wurde das Programm Graph Pad Prism verwendet.

In den Zellkulturmodellen setzte sich die Versuchszahl n aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zusammen ( $n=3$ ), wobei die jeweilige Behandlung im Duplikat durchgeführt wurde. Alle Tierexperimente umfassten mindesten drei Tiere pro Gruppe ( $n=3$ ).

### 3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil besteht aus vier Teilabschnitten. Im Ersten werden die Auswirkungen der systemischen Applikation von siRNA auf das murine, hepatische Immunsystem dargestellt.

Im zweiten Teilabschnitt wird die siRNA im Mausmodell gegen einen Wirtsfaktor eingesetzt, welcher die HCV-Replikation unterstützt (Isg15). Hier können die Vorteile der Kombination von siRNA mit etablierten HCV-Therapeutika heraus gearbeitet werden.

Aus der siRNA Anwendung ergibt sich der dritte Abschnitt, der zur näheren Charakterisierung des Wirtsfaktors Isg15 in zellulären Mechanismen der Leber dient.

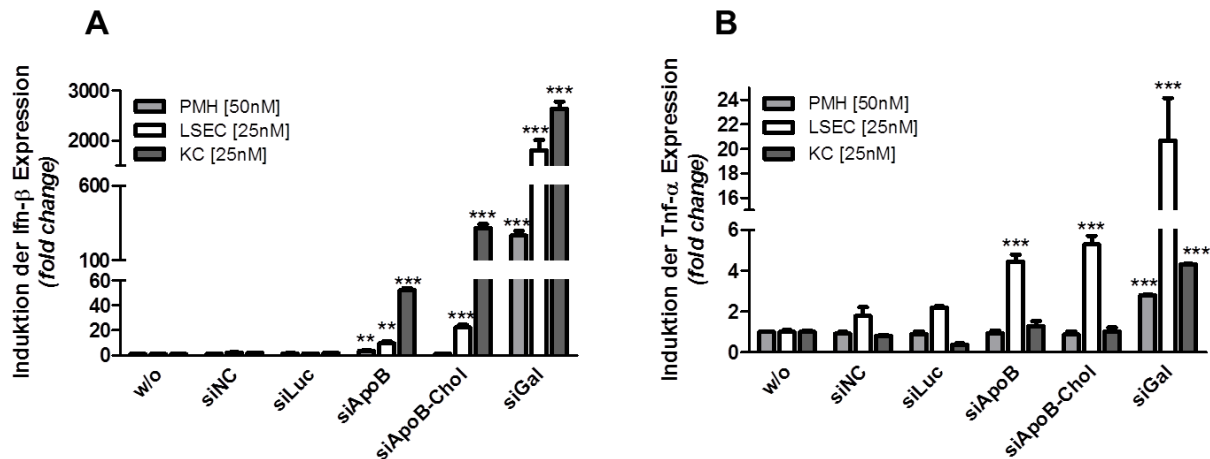
Im letzten Abschnitt findet die siRNA Technologie Anwendung in einem HBV-Mausmodell und dient zur näheren Untersuchung der angeborenen Immunantwort.

#### 3.1 Der Einfluss von siRNA auf das hepatische Immunsystem

Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten sind Teil der Publikation "*Chemical modifications on siRNAs avoid the Toll-like receptor mediated activation of the hepatic immune system in vivo and in vitro*" (Broering et al. 2013).

##### 3.1.1 Untersuchung von unterschiedlich modifizierten siRNAs und deren Induktion von zelltyp-spezifischer Immunantwort

Der therapeutische Einsatz von siRNA ist erst möglich, wenn ihre Wirkungsweise sowie die assoziierten Nebenwirkungen genau bekannt sind. Das Immunsystem ist unter anderem darauf ausgerichtet, fremde RNAs zu erkennen, z.B. RNAs viralen Ursprungs. Als Abwehrmechanismus werden dann z.B. verschiedene Zytokine freigesetzt. Um die leberspezifischen Nebenwirkungen von siRNAs, mit unterschiedlichen Sequenzen und die Auswirkungen chemischer Modifikationen, sowie Sequenzen zu untersuchen, wurden primäre Leberzellpopulationen (PMH, LSEC, KC) aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mit unterschiedlichen siRNAs transfiziert. Die unterschiedlichen siRNAs und ihre Modifikationen sind in der Tabelle 2.8 beschrieben. Nach 24h wurde die RNA isoliert und die Expression verschiedener Gene (Ifn- $\beta$ , Tnf- $\alpha$ ) mittels qRT-PCR bestimmt.

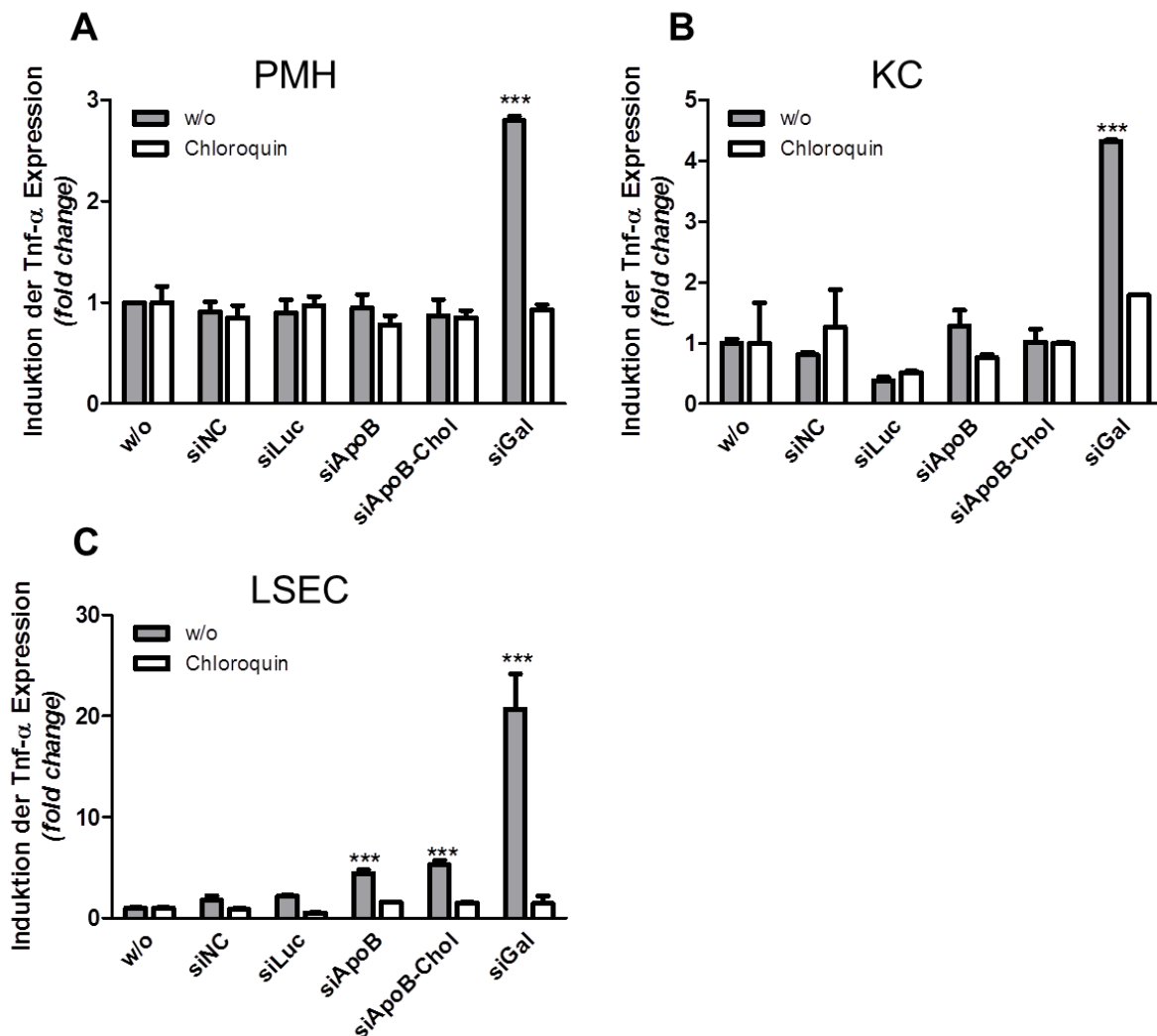


**Abb.3.1.1 Unterschiedlich modifizierte siRNAs induzieren eine zelltyp-spezifische Immunantwort in isolierten primären Leberzellen.** Aus 7 Wochen alten, männlichen C57BL/6 Mäusen wurden PMH, KC und LSEC isoliert. Diese wurden mit 50nM oder 25nM siRNA transfiziert. Die RNA wurde nach 24h extrahiert und die Genexpression von Ifn-β (A) und Tnf-α (B) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien β-Aktin normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Die Abb.3.1.1. zeigt, dass die unmodifizierte siRNA siGal in allen Zelltypen die Expression von Ifn-β (A) und Tnf-α (B) signifikant induzierte. Die Hepatozyten reagierten deutlich weniger auf die siGal, im Vergleich zu LSEC oder KC. Ebenso induzierte die Transfektion mit siApoB oder siApoB-Chol eine signifikante Expressionssteigerung von Ifn-β in allen Zelltypen, Tnf-α wurde hingegen nur in LSEC induziert. Die Modifikation der siApoB mit Cholesterol (siApoB-Chol) führte zu einer gesteigerten Ifn-β Expression im Vergleich zur siApoB in den KC. Die siRNA-induzierte Ifn-β Expression fiel in den KC am stärksten aus. Die LSEC wiesen hingegen die höchsten Tnf-α Expressionslevel auf. Die 2'-O-Methyl modifizierte siLuc rief in keiner der drei Zellpopulationen eine Immunreaktion hervor.

### 3.1.2 Chloroquin-Behandlung unterbindet die siRNA-vermittelte Immunantwort

Um zu untersuchen, ob endosomale PRRs an der siRNA-vermittelten Immunantwort beteiligt sind, wurden die primären hepatischen Zellen vor der siRNA Transfektion 30min mit Chloroquin behandelt. Chloroquin verhindert die Ansäuerung des Endosoms, und damit die Aktivierung der endosomalen TLRs. Nach 24h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und die Expression von Tnf-α, mittels qRT-PCR ermittelt.



**Abb.3.1.2 Eine Chloroquin-Vorbehandlung hebt die siRNA-vermittelte Immunantwort *in vitro* auf.** Aus 7 Wochen alten, männlichen C57BL/6 Mäusen wurden PMH (A), KC (B) und LSEC (C) isoliert. Diese wurden 30min mit Chloroquin [100µM] behandelt und anschließend mit 50nM (A) bzw. 25nM (B, C) siRNA transfiziert. Die RNA wurde nach 24h extrahiert und die Genexpression von Tnf-α mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien β-Aktin normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Die Behandlung mit Chloroquin hat den stimulatorischen Effekt der siGal in murinen Hepatozyten (Abb.3.1.2.A), murinen Kupfferzellen (B) und murinen LSECs (C) aufgehoben. Das gleiche galt für die, von siApoB oder siApoB-Chol, in mLSECs (C) verursachte Immunantwort.

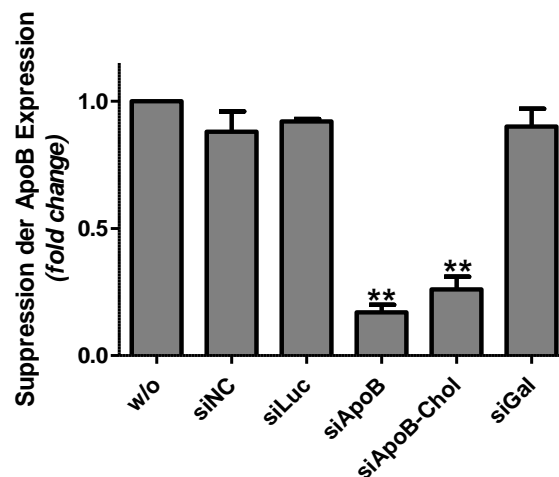
### 3.1.3 Der siRNA-vermittelte ApoB *Knockdown in vitro*

Die Sequenzen der verwendeten siLuc und siGal haben keinen eukaryotischen Ursprung und somit keinen *Knockdown* Effekt in murinen Zellen. Um zu zeigen, dass neben den beschriebenen immunmodulativen Effekten auch das *Knockdown*



Potential der verwendeten siRNAs vorhanden ist, wurde 24h nach Transfektion von Hepatozyten mit siRNA die RNA isoliert und die ApoB Expression mittels qRT-PCR bestimmt.

Die Abb.3.1.3 zeigt einen signifikanten *Knockdown* des Hepatozyten Markers ApoB nach Verwendung der ApoB spezifischen siRNAs von  $82,9\% \pm 3,1$  (Mittelwert  $\pm$  SEM) (siApoB) und  $74,5\% \pm 5,3$  (Mittelwert  $\pm$  SEM) (siApoB-Chol) 24h nach Transfektion. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die siRNAs nach der Transfektion ins Zytoplasma gelangten und dort zum Abbau von ApoB-mRNAs führten. Die Cholesterol Modifikation wirkte sich geringfügig negativ auf die *Knockdown* Effizienz der siRNA aus. Die nicht kodierenden siRNAs (siNC, siLuc, siGal) beeinflussten die ApoB Expression nicht.



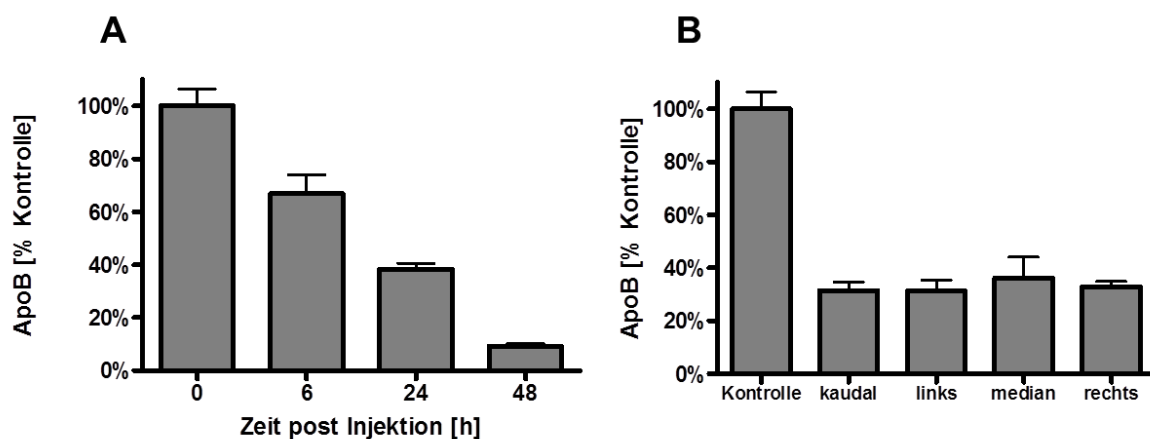
**Abb.3.1.3 Die *Knockdown* Effizienzen der ApoB siRNAs *in vitro*.** Aus 7 Wochen alten, männlichen C57BL/6 Mäusen wurden PMH isoliert. Diese wurden mit 50nM siRNA transfiziert. Die RNA wurde nach 24h extrahiert und die Genexpression von ApoB mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin normalisiert (Mittelwerte  $\pm$  SEM). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

### 3.1.4 Der siRNA-vermittelte ApoB *Knockdown in vivo*

Für die *in vivo* Anwendung von siRNA sollen in dieser Arbeit die Parameter wie *Knockdown* Effizienzen, Organ- und Zellspezifität sowie die Toxizität der unterschiedlichen siRNAs untersucht werden. Die *in vitro* verwendeten siRNAs (Sequenzen inklusive Modifikationen) wurden von der Firma Roche Kulmbach GmbH (heute Axolabs GmbH) als Lipid-Nanopartikel (LNP01) Formulierung zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde der *Knockdown* des leberspezifischen Markers ApoB im *in*

*vivo*-Einsatz evaluiert. Hierzu wurden 7-9 Wochen alte C57BL/6 Mäuse mit einer LNP01-siRNA Dosierung von 4µg/g Körpergewicht i.v. injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (6h, 24h, 48h) nach Applikation wurde die Leber entnommen, die RNA isoliert und die ApoB-mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt.

Der hepatische *Knockdown* von ApoB ist im Zeitverlauf in Abb.3.1.4.A dargestellt. Dieser betrug 6h nach Applikation der spezifischen siApoB 33,2%±11,5 (Mittelwert±SEM; p=0,0036).

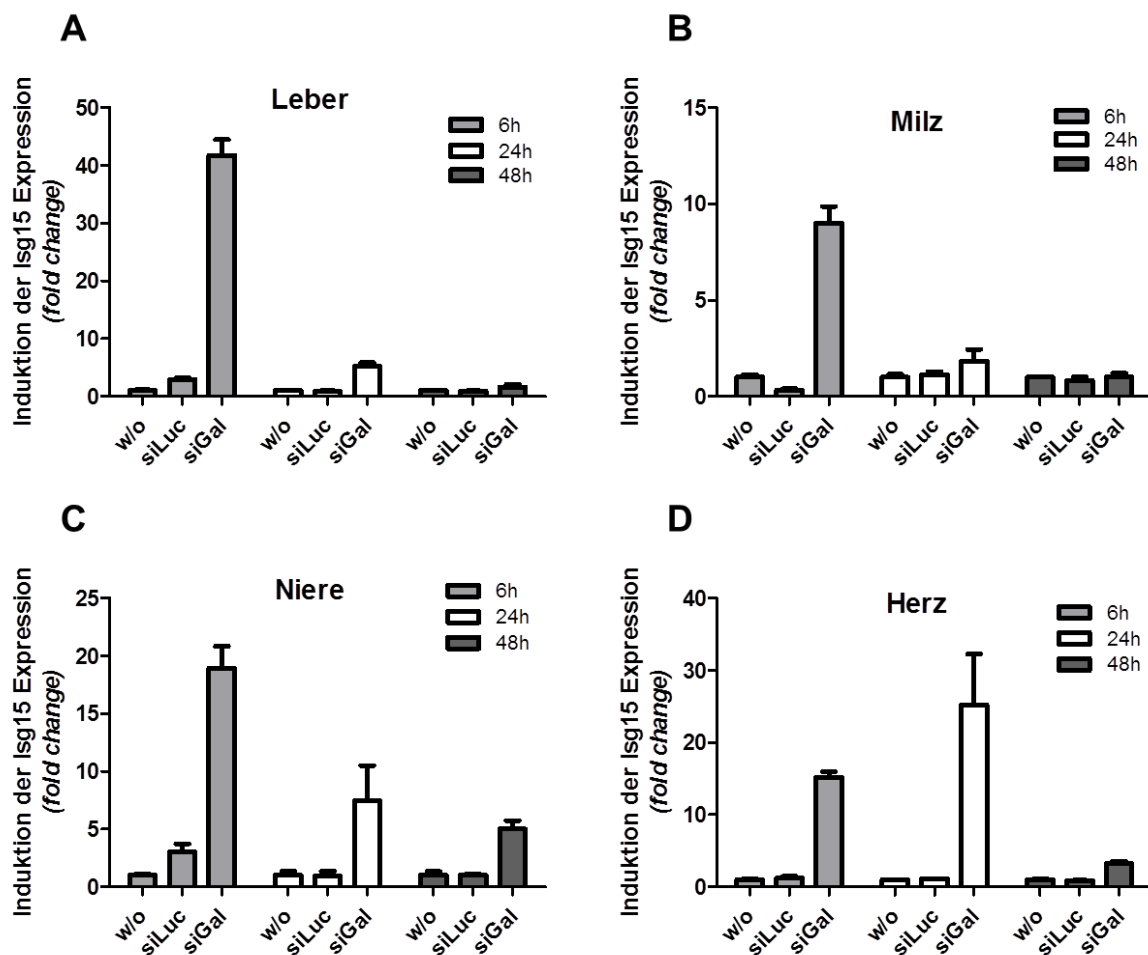


**Abb.3.1.4 Nanolipid-formulierte (LNP01) siRNAs supprimieren die hepatische Genexpression *in vivo*.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Die Entnahme der verschiedenen Leberlappen erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion. Die RNA wurde extrahiert und die Genexpression von ApoB mittels qRT-PCR in der Leber im Zeitverlauf (A) und in den verschiedenen Leberlappen nach 24h (B) dargestellt. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM).

Nach 24h erreichte der *Knockdown* 61,1%±4,7 (Mittelwert±SEM; p<0,0001) und nach 48h 90,2%±6,7 (Mittelwert±SEM; p=0,0001). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass bei systemischer Applikation der siRNA ein hepatischer *Knockdown* und somit ein Eintreten der siRNA in hepatische Zellen erfolgt war. Weiterhin wurde untersucht, ob der *Knockdown* und somit die Verteilung der siRNA innerhalb der Leber in allen Leberlappen gleichmäßig war. Hierzu wurden die unterschiedlichen Leberlappen 24h nach Gabe von siRNA entnommen und die *Knockdown* Effizienz bestimmt. Abb.3.1.4.B zeigt, dass in allen Leberlappen die *Knockdown* Effizienz vergleichbar war, im Durchschnitt 67%±1,9 (Mittelwert±SEM). Diese Daten lassen auf eine gleichmäßige Verteilung der siRNA innerhalb der Leber schließen. Als Kontrollen dienten jeweils unbehandelte und mit PBS injizierte Tiere. In allen nachfolgenden *in vivo*-Experimenten wurde, auf Grund der vereinheitlichten Ergebnisse, der linke Leberlappen verwendet.

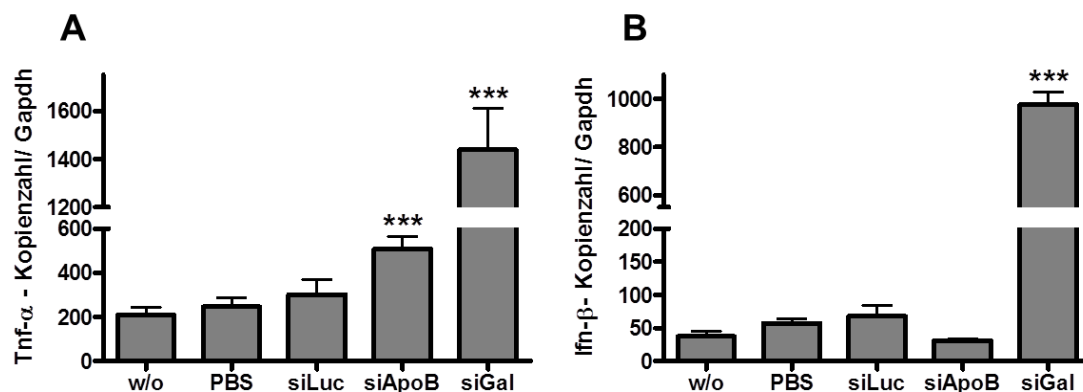
### 3.1.5 Die lokale und systemische, siRNA induzierte Immunantwort *in vivo*

Nachdem der Nachweis erbracht worden war, dass sich nach systemischer siRNA Applikation diese gleichmäßig in der murinen Leber verteilt (Abb.3.1.4.B), wurden für die Analysen der siRNA-vermittelten Immunantwort *in vivo* die siRNAs siLuc und siGal verwendet. Die *in vitro* Versuche hatten gezeigt, dass sich die 2'-O-Methyl modifizierte siLuc als Werkzeug für eine nicht immunreaktive Kontroll-siRNA verwenden ließ und die siGal ein hohes immunreaktives Potential induzierte. Zu verschiedenen Zeitpunkten (6h, 24h, 48h) nach i.v. siRNA Applikation (4µg/g Körpergewicht) wurde der linke Leberlappen, die Milz, das Herz und die rechte Niere der C57BL/6 Mäuse entnommen, die RNA isoliert und die Expression verschiedener Immungene (Isg15, Ifn-β, Tnf-α) mittels qRT-PCR bestimmt.



**Abb.3.1.5 Die Applikation der siRNA induziert in verschiedenen Organen eine Immunantwort.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Die Organentnahme erfolgte 6h, 24h und 48h nach der Injektion. Die RNA wurde extrahiert und die Genexpression von Isg15 mittels qRT-PCR in Leber (A), Milz (B), Niere (C) und Herz (D) analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM).

Exemplarisch zeigt die Abb.3.1.5 die Isg15 Expression in den verschiedenen Geweben. Zum einen wird deutlich, dass siGal eine starke Immunantwort in allen Organen auslöste, im Gegensatz zu siLuc, welche keine oder nur marginale Expressionssteigerungen auslöste. In der Leber (A), der Milz (B) und den Nieren (C) war die höchste Isg15 Expression 6h nach siRNA Applikation zu verzeichnen, welche in Leber und Milz nach 48h wieder ein basales Niveau erreicht hatte, während in den Nieren noch immer eine erhöhte Isg15 Expression nach siGal Applikation messbar war. Im Herzgewebe war die Zeitkurve etwas verschoben, so dass 24h nach Applikation die maximale Expressionssteigerung von Isg15 erreicht wurde, welche nach 48h aber auch wieder basales Niveau erreicht hatte.

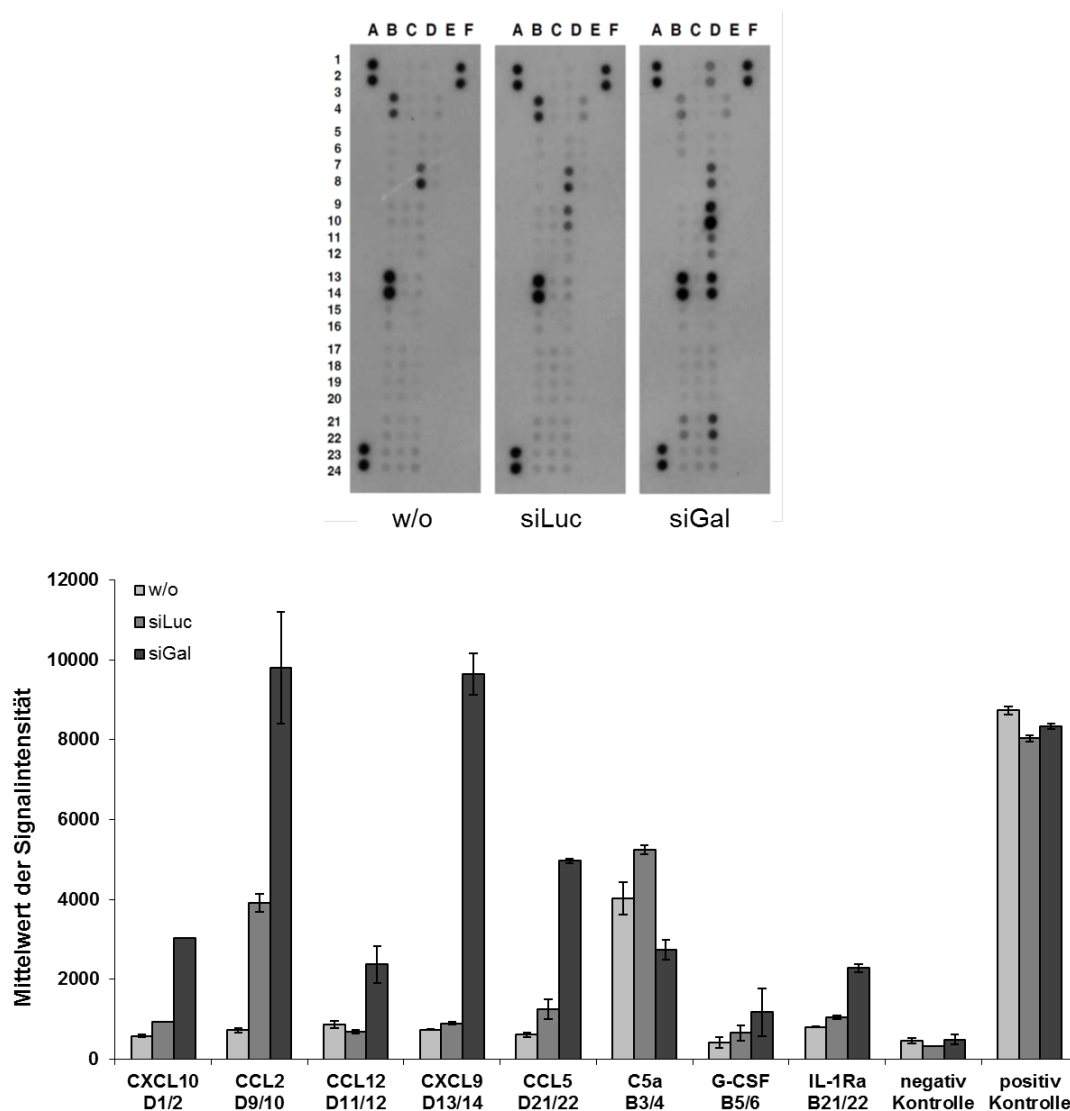


**Abb.3.1.6 Unterschiedlich modifizierte siRNAs aktivieren das hepatische Immunsystem.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Die Leberentnahme erfolgte 6h nach der Injektion. Die RNA wurde extrahiert und die Genexpression von Tnf-α (A) und Ifn-β (B) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

*In vivo* konnte 6h nach siRNA Applikation in totalem Lebergewebe eine Immunreaktion durch die siRNAs, siGal und siApoB, induziert werden. Die Expression von Tnf-α (Abb.3.1.6.A) und Ifn-β (B) unterschied sich in unbehandelten (w/o), PBS und siLuc Tieren nicht. Tiere, die siGal erhielten, zeigten eine signifikante Induktion der Tnf-α und Ifn-β Expression (je p<0,0001), die siRNA siApoB induzierte *in vivo* nur eine signifikant erhöhte Tnf-α Expression (p<0,001).

Mittels des Proteom Profiler-Cytokine Array Panel A Kits wurde die systemische Immunantwort untersucht, indem Zytokinlevel im Serum der siLuc und siGal behandelten Mäuse bestimmt wurden. Die siGal wies im Vergleich zur siLuc und unbehandelten Tieren folgendes Panel an hochregulierten Zytokinen (Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF), IL-1 Rezeptor Agonist) und Chemokine (C-C

Motiv-Liganden: CCL2, CCL5, CCL12 und C-X-C Motiv-Liganden: CXCL9, CXCL10) im Serum auf (Abb.3.1.7).



**Abb.3.1.7 Unterschiedlich modifizierte siRNAs erhöhen die Zytokinlevel im Serum.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. 6h nach der Injektion wurde mittels Orbitalpunktion Blut entnommen, das Serum von drei Mäusen wurde vereinigt und 150µl Serum wurden für den *Proteom Profiler: Mouse Cytokine Array* verwendet. Es wurde die Lichtsignalintensität quantifiziert und visualisiert.

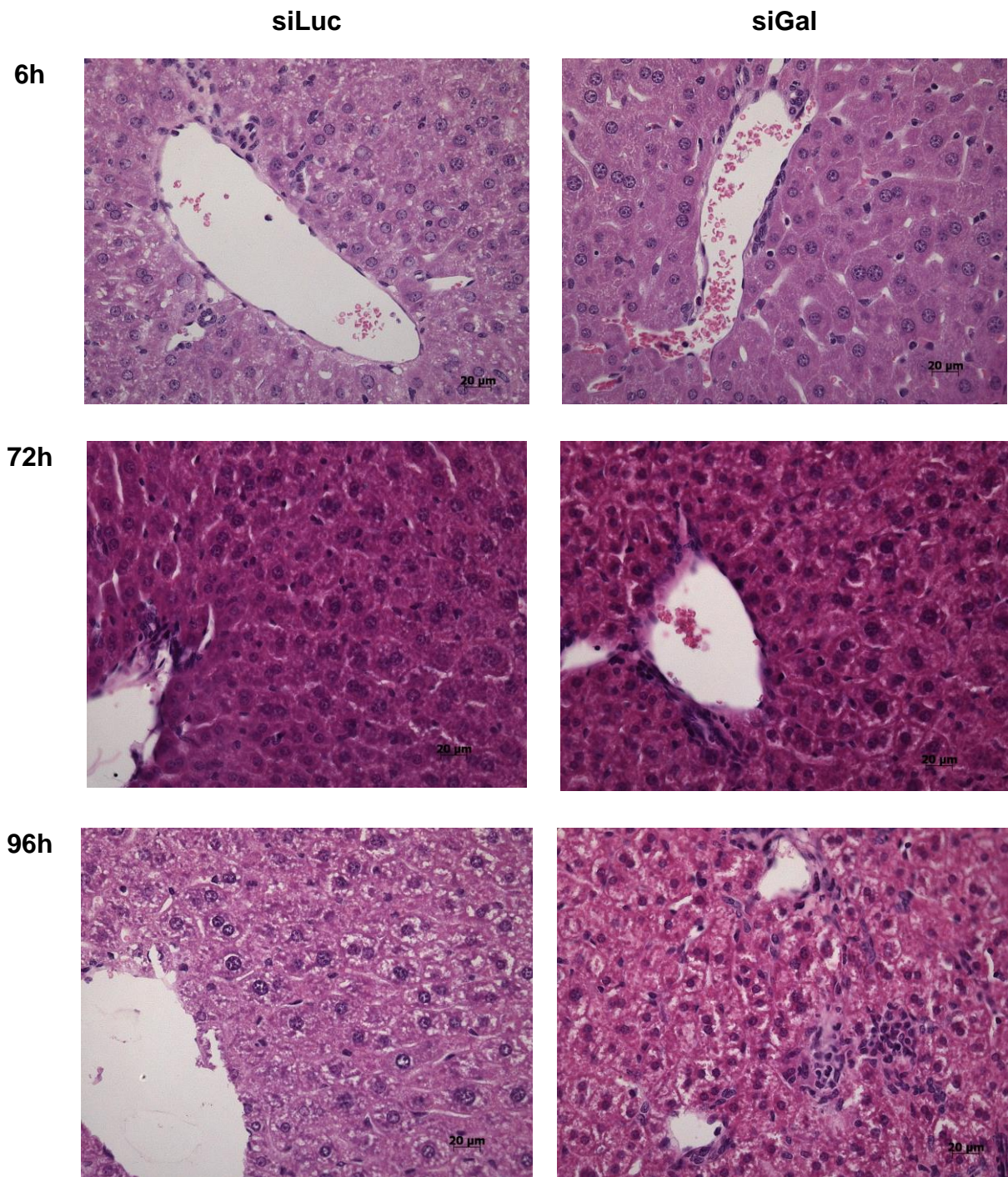
Zur Bestimmung der hepatischen Toxizität der siRNAs wurden Transaminasen (GOT/AST, GPT/ALT), LDH, Albumin, Bilirubin und das Gesamtprotein ermittelt, dargestellt in Tabelle 3.1. Diese unterschieden sich nicht zwischen unbehandelten, siLuc oder siGal Tieren.

**Tabelle 3.1 Lebertransaminasen im Serum nach siRNA Behandlung.**

	<b>w/o</b> (Mittelwert $\pm$ SEM)	<b>siLuc</b> (Mittelwert $\pm$ SEM)	<b>siGal</b> (Mittelwert $\pm$ SEM)
<b>AST/ GOT</b> (IU/L)	27,0 $\pm$ 11,5	43,7 $\pm$ 9,8	46,7 $\pm$ 8,9
<b>ALT/GPT</b> (IU/L)	26,7 $\pm$ 9,7	29,3 $\pm$ 5,4	30,7 $\pm$ 10,4
<b>LDH</b> (IU/L)	563,3 $\pm$ 95,1	630,0 $\pm$ 53,7	692,0 $\pm$ 112,2
<b>Albumin</b> (g/dl)	2,3 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1
<b>Bilirubin</b> (mg/dl)	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 2,7	0,2 $\pm$ 0,1
<b>Gesamtprotein</b> (g/dl)	4,7 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,1

Die histologischen Untersuchungen der HE gefärbten Lebern dieser Mäuse zu den Zeitpunkten 6h, 72h und 96h nach Applikation unterstützten diese Ergebnisse, da die Lebern keinerlei Auffälligkeiten wie Nekrosen oder Infiltrate von Immunzellen aufwiesen (Abb.3.1.8).

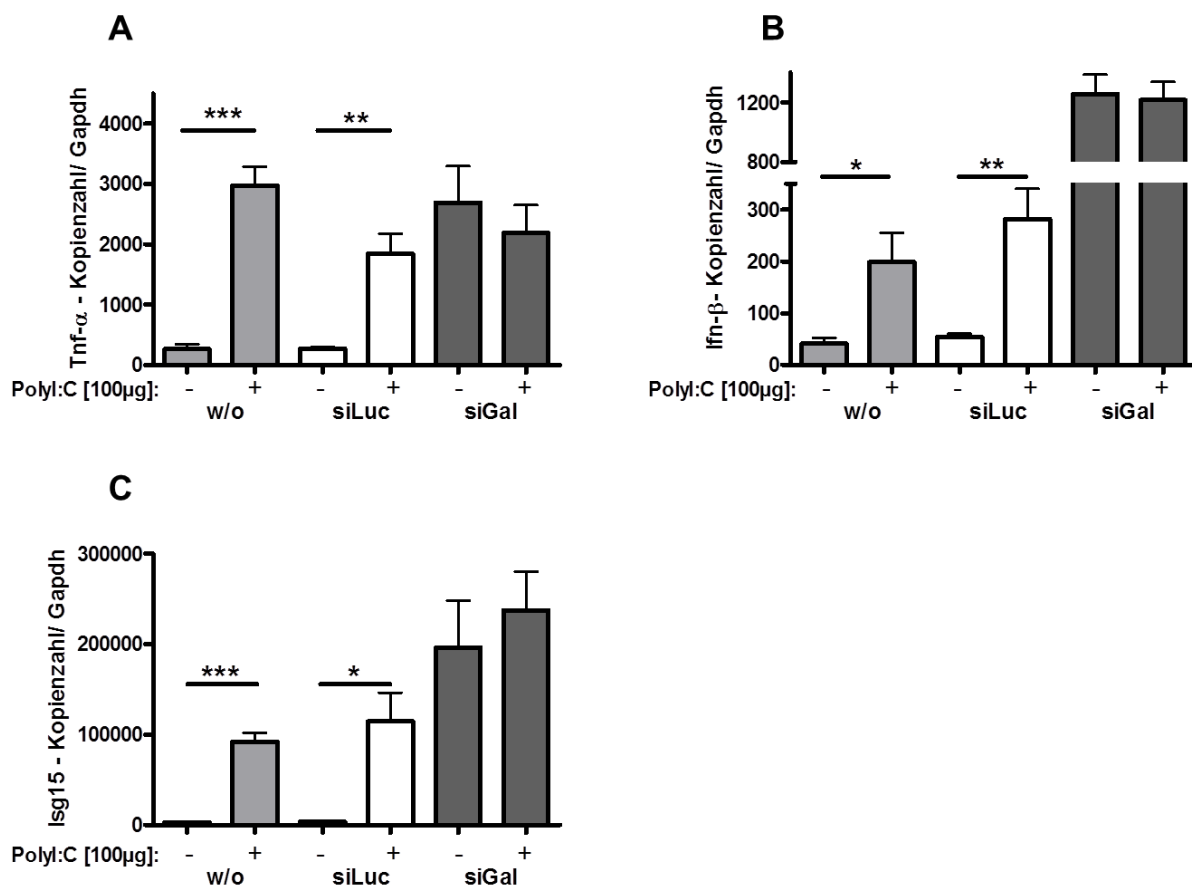




**Abb.3.1.8 HE Färbung von murinem Lebergewebe.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Zu verschiedenen Zeitpunkten (6h, 72h, 96h) nach der Injektion wurden die Lebern entnommen, das Lebergewebe fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Es wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung durchgeführt. In 40x Vergrößerung abgebildet.

### 3.1.6 Das durch siRNA aktivierte, hepatische Immunsystem reagiert nicht auf PolyI:C

Das folgende Experiment sollte zeigen, ob sich das hepatische Immunsystem nach siRNA Applikation zusätzlich noch über endosomale TLRs stimulieren lässt. Als zusätzlicher Stimulus wurde PolyI:C verwendet. PolyI:C ist eine synthetisch hergestellte doppelsträngige RNA und simuliert virale dsRNA, welche den Liganden für den TLR3 darstellt. PolyI:C aktiviert den TLR3 und induziert damit die Expression von Zytokinen, IFN und ISGs. C57BL/6 Mäuse bekamen 3h nach Applikation der siRNA (siLuc und siGal) zusätzlich PolyI:C in einer Dosierung von 4µg/g Körpergewicht i.v. verabreicht. Die Gewebeentnahme erfolgte 6h nach der PolyI:C Injektion.



**Abb.3.1.9 Ein durch siRNAs vorstimuliertes hepatisches Immunsystem reagiert nicht auf PolyI:C.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Zusätzlich wurde den Mäusen nach 3h PolyI:C (4µg/g) i.v. verabreicht. Die Leberentnahme erfolgte 6h nach der zweiten Injektion. Die RNA wurde extrahiert und die Genexpression von Tnf-α (A), Ifn-β (B) und Isg15 (C) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

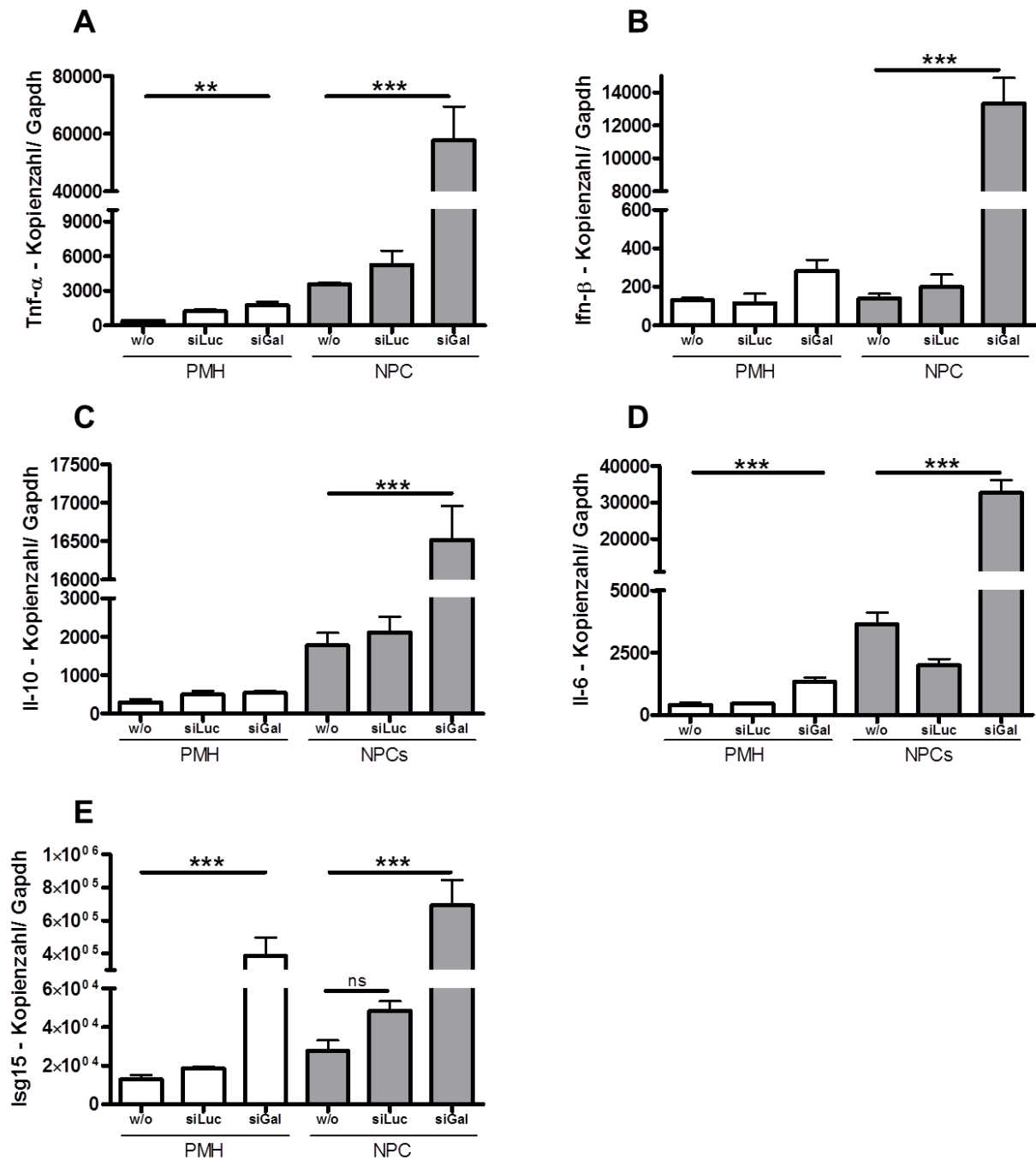


PolyI:C ruft in unbehandelten sowie in siLuc behandelten Tieren eine signifikante Expressionssteigerung von Tnf- $\alpha$  (Abb.3.1.9.A) ( $p<0,001$ ), Ifn- $\beta$  (B) ( $p<0,05$ ) und Isg15 (C) ( $p<0,01$ ) hervor. Die durch siGal vorstimulierten Tiere zeigten keine zusätzliche Aktivierbarkeit des Immunsystems durch PolyI:C.

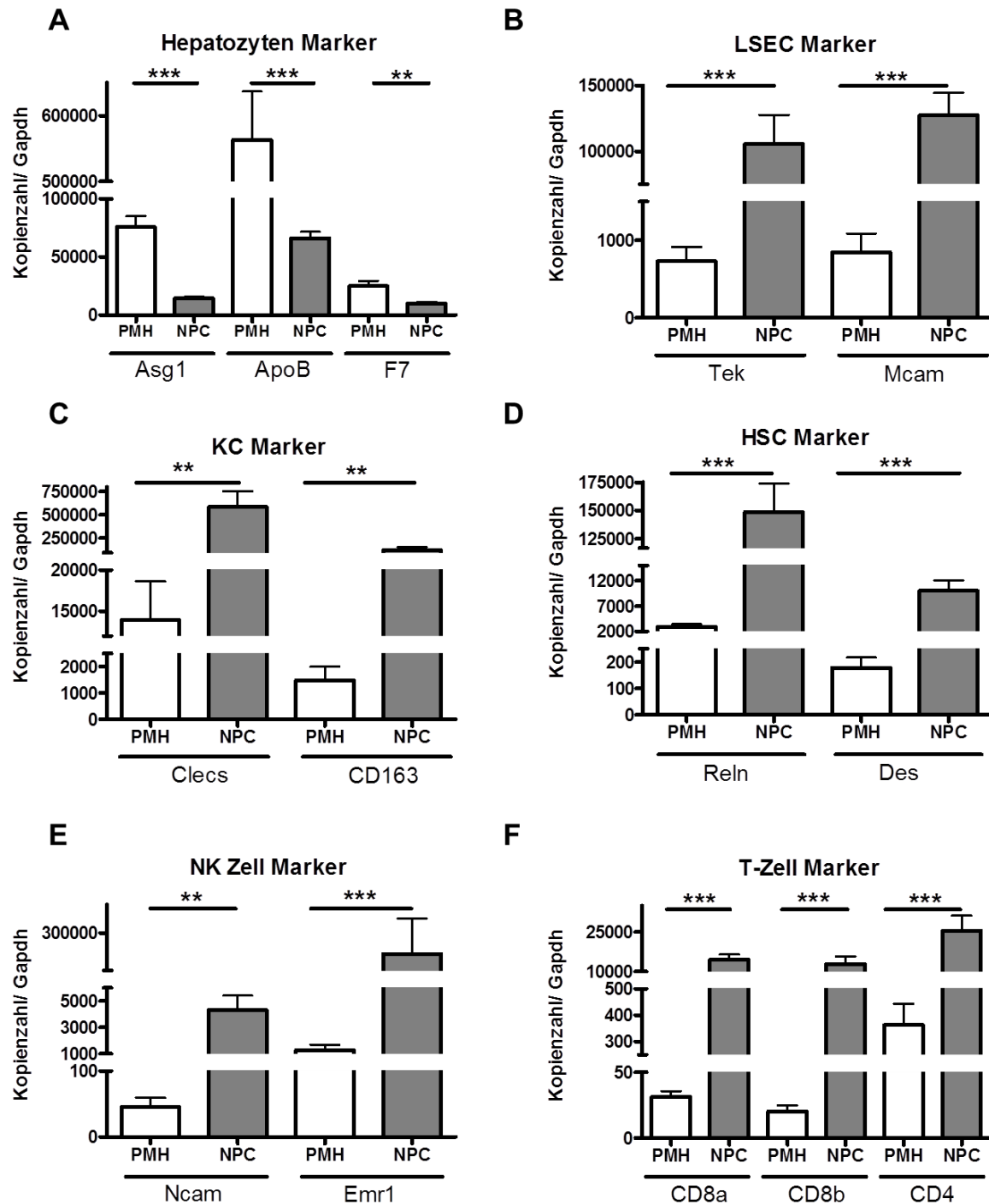
### **3.1.7 Die hepatische Immunantwort *in vivo* wird durch die NPCs induziert**

Die *in vitro* Analysen haben gezeigt, dass die verschiedenen Leberzellpopulationen unterschiedlich stark auf die siRNA Transfektion reagiert haben. Um die Immunantwort *in vivo* den verschiedenen Leberzellpopulationen zuordnen zu können, wurden aus C57BL/6 Mäusen 6h nach LNP01-siRNA Injektion Hepatozyten und ein Mix aus NPCs isoliert und direkt in Qiazol aufgenommen, die RNA extrahiert und die Expression verschiedener Gene (Tnf- $\alpha$ , Ifn- $\beta$ , Il-10, Il-6 und Isg15) mittels qRT-PCR bestimmt.

Dieses Experiment zeigte, dass die hepatische Immunantwort durch NPC bestimmt wurde. Wie schon beschrieben induzierte nur die siGal eine Immunreaktion, diese aktivierte die signifikante Transkription von Tnf- $\alpha$  (Abb.3.1.10.A), Ifn- $\beta$  (B) und Il-10 (C) ausschließlich in den NPCs ( $p<0,0001$ ). Eine Aktivierung durch die siGal in Hepatozyten ( $p=0,0007$ ) und NPCs ( $p<0,0001$ ) konnte für Il-6 (D) und Isg15 (D) gezeigt werden, welches durch die Ifn- $\beta$  Produktion in den NPCs angeregt wird. Die Reinheit der Zellpopulationen (PMH und NPC) wurde standardmäßig analysiert, mittels qRT-PCR wurden sie auf verschiedene molekulare Zellmarker untersucht.



**Abb.3.1.10 Die siRNA-induzierte hepatische Immunantwort ist auf die NPC begrenzt.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200  $\mu$ l der LNP01-formulierten siRNA (4  $\mu$ g/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Die Isolation von PMH und NPC erfolgte 6h nach der Injektion. Die RNA wurde extrahiert und die Genexpression von Tnf- $\alpha$  (A), Ifn- $\beta$  (B), Il-10 (C) Il-6 (D) und Isg15 (D) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte  $\pm$  SEM). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

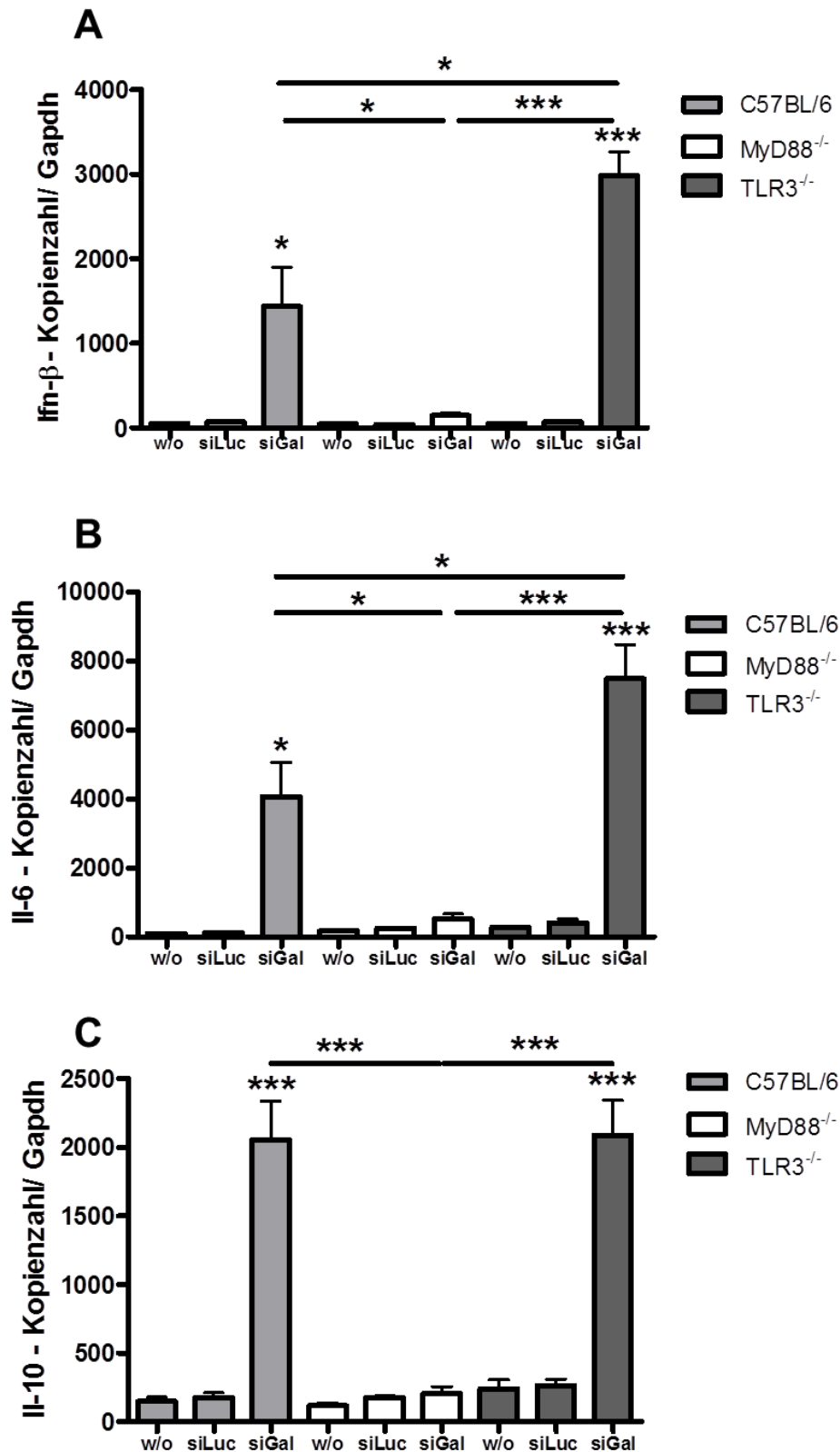


**Abb.3.1.11 Reinheitsanalyse anhand zelltyp-spezifischer Marker in PMH und NPC.** Nach der Isolation von PMH und NPC wurde standardmäßig die Reinheit der verschiedenen Zellpopulationen mittels qRT-PCR analysiert. Es wurden Asg1, ApoB und F7 als Hepatozyten Marker verwendet (A), Tek und Mcam als LSEC Marker (B), Clec3 und CD163 als KC Marker (C), Reln und Des als HSC Marker (D), Ncam und Emr1 als NK Zell Marker (E), sowie CD8a, CD8b und CD4 als T-Zell Marker (F). Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Die isolierten Hepatozyten exprimierten signifikant mehr Hepatozyten Marker als die NPC (Abb.3.1.11.A). Weiterhin zeigt die Abb.3.1.11, dass sich der NPC Mix aus LSEC (B), KC (C), HSC (D), NK-Zellen (E) und T-Zellen (F) zusammensetzt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die PMH Präparationen nur einen geringen Anteil an NPCs enthielten, während die NPCs einen deutlichen Anteil an PMH enthielten (A). Die Aufreinigung der NPCs erfolgte, wie unter 2.2.3.1 beschrieben, aus dem Überstand der Hepatozyten-Präparation, um die Anzahl der Versuchstiere möglichst klein zu halten. Die Standardprozedur für LSECs und KCs erfordert jeweils 10 Tiere/Experiment. Mit der hier etablierten Methode konnte der NPC Mix aus nur einer Maus gewonnen werden.

### **3.1.8 Die siRNA induzierte Immunantwort *in vivo* wird von MyD88-abhängigen Signalkaskaden ausgelöst**

Die siRNA-vermittelte Immunantwort *in vitro* wurde durch die Chloroquin-Behandlung inhibiert, was auf einen endosomalen Wirkmechanismus schließen lässt. Da bekannt ist, dass endosomale *Toll-like* Rezeptoren für die Erkennung von (fremder) RNA zuständig sind (Karikó *et al.* 2005), wurde die Immunantwort nach siRNA Applikation in TLR3<sup>-/-</sup> und MyD88<sup>-/-</sup> *Knockout* Tieren *in vivo* untersucht. Die Leberentnahme erfolgte 6h nach Applikation von siLuc oder siGal. RNA und Gesamtprotein wurde extrahiert und die Expression von Ifn- $\beta$ , Il-6 und Il-10 wurde mittels qRT-PCR determiniert.

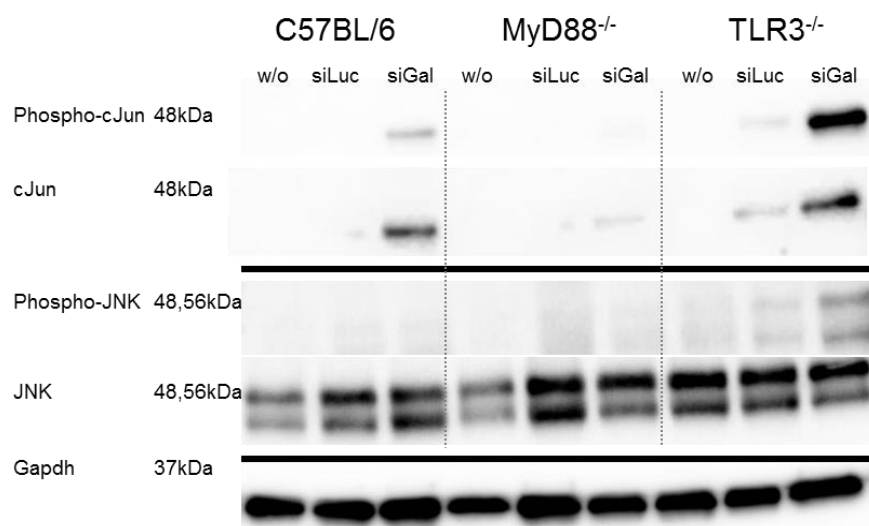


**Abb.3.1.12 Die siRNA-induzierte hepatische Immunantwort wird durch einen MyD88-abhängigen Signalweg vermittelt.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6, MyD88<sup>-/-</sup> und TLR3<sup>-/-</sup> Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Die Leberentnahme erfolgte 6h nach der Injektion. Die RNA wurde extrahiert und die Genexpression von Ifn- $\beta$  (A) IL-6 (B) und IL-10 (C) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000

Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte $\pm$ SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

In Wildtyp (WT; C57BL/6) und TLR3<sup>-/-</sup> Mäusen war die Ifn- $\beta$  Expression (Abb.3.1.12.A), durch die Applikation von siGal signifikant erhöht, während die MyD88<sup>-/-</sup> Tiere keine Immunreaktion zeigten.

Ähnliche Ergebnisse nach siGal Applikation wurden auch für pro-inflammatorische Zytokine wie Il-6 (B), sowie das anti-inflammatorische Il-10 (C) ermittelt. Die siLuc induzierte in keinem der Tiere eines der Zytokine, unabhängig vom genetischen Hintergrund. Um zu analysieren, welche *downstream* Mechanismen der TLR Signalwege beteiligt sind, wurden aus Lebergewebe extrahierte Proteine mittels Western Blot analysiert. Es wurde die Expression und Phosphorylierung der Signalmoleküle cJun und c-Jun N-terminale Kinase (JNK) analysiert.



**Abb.3.1.13 Die siRNA-induzierte hepatische Immunantwort wird durch einen MyD88- und JNK-abhängigen Signalweg vermittelt.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6, Myd88<sup>-/-</sup> und TLR3<sup>-/-</sup> Mäuse erhielten 200 $\mu$ l der LNP01-formulierten siRNA (4 $\mu$ g/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. 6h nach der Injektion wurde die Leber entnommen, Gesamtprotein isoliert und 30 $\mu$ g mittels Western Blot analysiert.

Diese Analyse zeigt (Abb.3.1.13) die verstärkte Expression von cJun sowie die cJun Phosphorylierung in Wildtyp Mäusen und in TLR3<sup>-/-</sup> *Knockout* Tieren, während in den MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen beide Proteinformen nicht detektierbar waren. Schon auf mRNA Ebene konnte gezeigt werden, dass TLR3<sup>-/-</sup> Mäuse, verglichen mit dem WT, eine signifikant verstärkte Immunantwort auf die siGal zeigten. So war auch die

Phosphorylierung von JNK in diesen Tieren noch detektierbar, in WT und MyD88<sup>-/-</sup> Tieren jedoch nicht. JNK ist ein *upstream* Signalmolekül von cJun, welches dieses phosphoryliert. Genau wie auf mRNA Ebene zeigten die Tiere keine Reaktion auf siLuc, unabhängig vom Mausstamm. Für weitere Signalmoleküle konnten unabhängig vom Mausstamm keine Unterschiede zwischen unbehandelten, siLuc und siGal Tieren festgestellt werden.

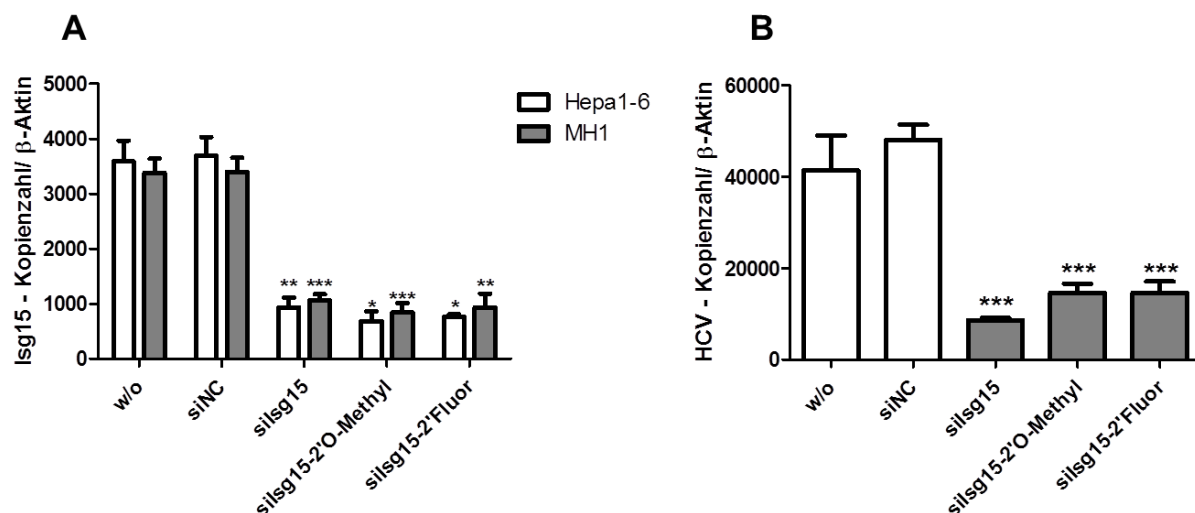
## 3.2 Der Isg15 *Knockdown in vivo* und seine therapeutische Relevanz

### 3.2.1 Untersuchung des Isg15 *Knockdowns in vitro* und *in vivo*

In Ihrer Dissertation konnte Ruth Broering schon 2007 zeigen, dass Isg15 einen proviralen Wirtsfaktor in der HCV-Replikation darstellt. Der siRNA induzierte *Knockdown* führt zur Suppression der HCV-Replikation (Broering *et al.* 2010). In dieser Arbeit sollte nun gezeigt werden, dass ein leber-gerichteter Isg15-*Knockdown* im Mausmodell möglich ist. Zudem sollte die Zellspezifität der siRNA in der Leber, ihr Effekt auf die Interferonantwort, sowie der mögliche Einsatz im HCV-Mausmodell, untersucht werden.

Die Firma Roche Kulmbach GmbH (heute Axolabs GmbH) hat uns die Lipidnanopartikel formulierte (LNP01) siRNAs zur Verfügung gestellt. Es wurden drei verschiedene Isg15-siRNAs synthetisiert, alle mit der gleichen Sequenz, jedoch mit unterschiedlichen Ribose Modifikationen, unmodifiziert (silsg15), methyliert (silsg15-2'-O-Methyl) oder fluoriert (silsg15-2'-Fluor). Als Kontrollen dienten *in vivo* die siLuc oder *in vitro* die siNC (*negative control*) von der Firma Qiagen.

Zunächst wurden mittels Transfektion von 5nM siRNA die *Knockdown* Effizienzen der drei Isg15-siRNAs in den murinen Hepatomzelllinien MH1 und Hepa1-6 überprüft.

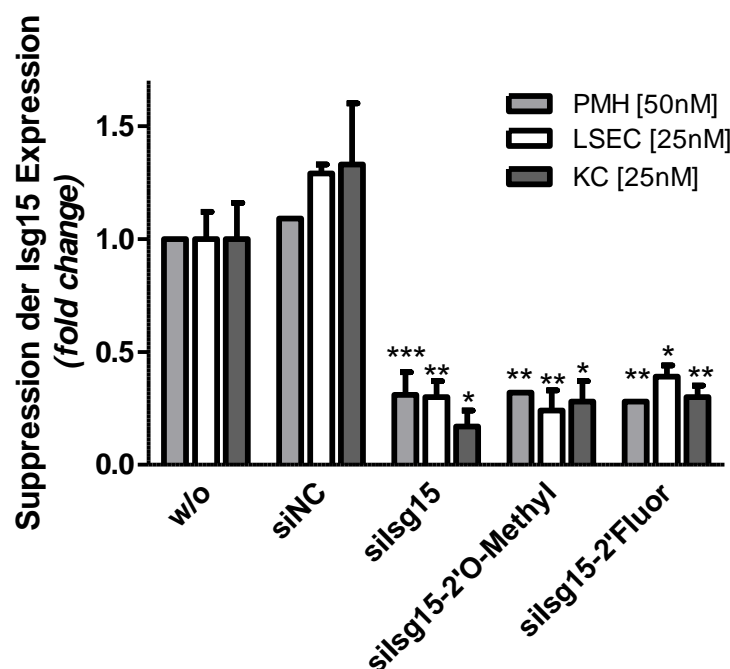


**Abb.3.2.1 Der Isg15 *Knockdown* und sein Effekt auf die HCV-Replikation.** Die murinen Hepatomzelllinien Hepa1-6 und MH1 wurden mit 5nM siRNA, Isg15-spezifische siRNAs, sowie die siNC als Kontrolle, transfiziert. 24h (A) bzw. 72h (B) nach Transfektion wurde die RNA isoliert und die Genexpression von Isg15 (A) und HCV (B) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien β-Aktin normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001



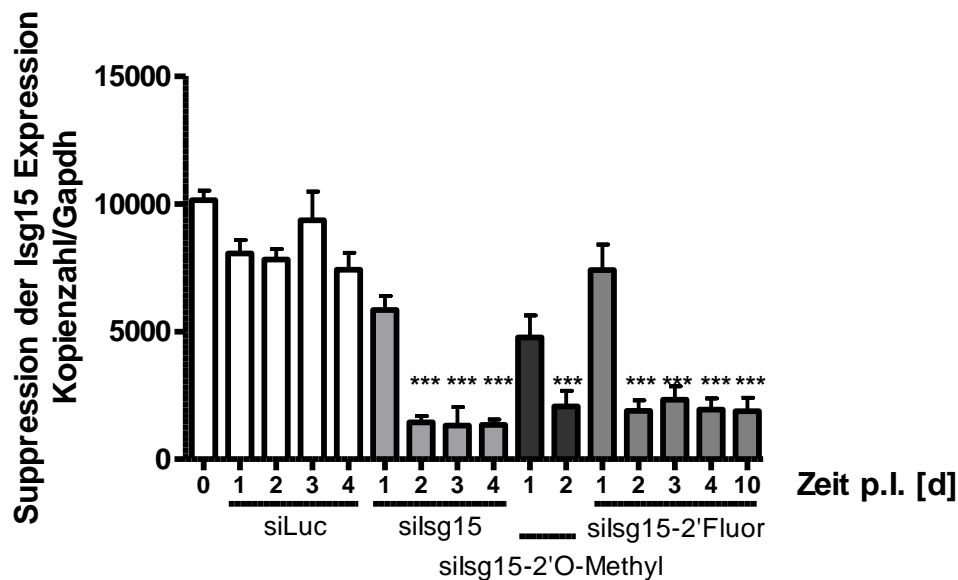
Die Abb.3.2.1.A zeigt qRT-PCR Daten der Isg15 Expression in Hepa1-6 und MH1 Zellen. Ein signifikanter *Knockdown* der Isg15 Expression wurde durch alle drei siRNAs induziert, unabhängig von der Ribose Modifikation. Die MH1 Zellen sind ein HCV subgenomisches Replikon System, in diesem konnte auch der Effekt der siRNAs auf die HCV-Replikation untersucht werden. Auch mit den modifizierten Isg15-spezifischen siRNAs wurde eine HCV Suppression nach 72h erreicht (B).

Der nächste Schritt war die Isg15 *Knockdown* Effizienz in primären, murinen Leberzellpopulationen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Hepatozyten (PMH), LSEC und KC aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mit den verschiedenen Isg15-spezifischen siRNAs transfiziert, nach 24h wurden die Zellen geerntet, RNA isoliert und mittels qRT-PCR der Isg15 *Knockdown* bestimmt. Ein *Knockdown* der Isg15 Expression in PMH, LSEC und KC konnte mit allen Isg15-spezifischen siRNAs erzielt werden. Auch in den Primärzellen hatten die Ribose-Modifikationen keinen Effekt auf die *Knockdown*-Effizienz. Die durchschnittliche Suppression der Isg15 Expression lag bei  $71\% \pm 6$  (Mittelwert  $\pm$  SEM) (Abb.3.2.2).



**Abb.3.2.2 Die Isg15 *Knockdown* Effizienzen in unterschiedlichen Leberzellpopulationen.** Aus 7 Wochen alten, männlichen C57BL/6 Mäusen wurden PMH, LSEC und KC Zellen isoliert. Diese wurden mit 25 bzw. 50nM siRNA, Isg15-spezifische siRNAs, sowie die siNC als Kontrolle, transfiziert. 24h nach Transfektion wurde die RNA isoliert und die Genexpression von Isg15 mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin normalisiert (Mittelwerte  $\pm$  SEM). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

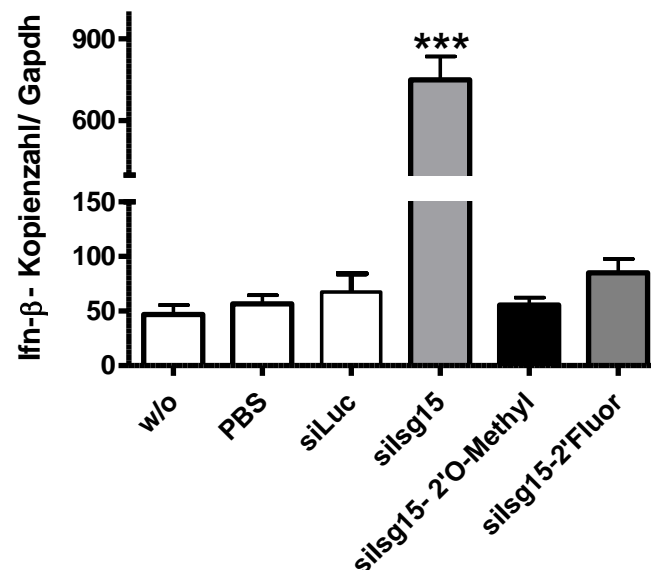
Die *in vivo* Applikation der Lipidnanopartikel (LNP01) formulierten siRNAs erfolgte mit 4µg/g Körpergewicht intravenös (i.v.) in C57BL/6 Mäuse. Zu verschiedenen Zeitpunkten (6h sowie 1 bis 10 Tage) nach Applikation wurden die Leber, Milz, Niere, Herz und Blut der Tiere entnommen und mittels qRT-PCR auf einen Isg15 spezifischen *Knockdown* sowie auf immunstimulative Nebenwirkungen untersucht.



**Abb.3.2.3 Zeitverlauf des Isg15 *Knockdowns* im gesamten Lebergewebe.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g), die Isg15-spezifischen siRNAs, sowie die siLuc und PBS als Kontrollen, durch eine Injektion in die Schwanzvene. Die Leberentnahme erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion. Die RNA wurde extrahiert und die Genexpression von Isg15 mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001 d: days (Tage nach der Injektion)

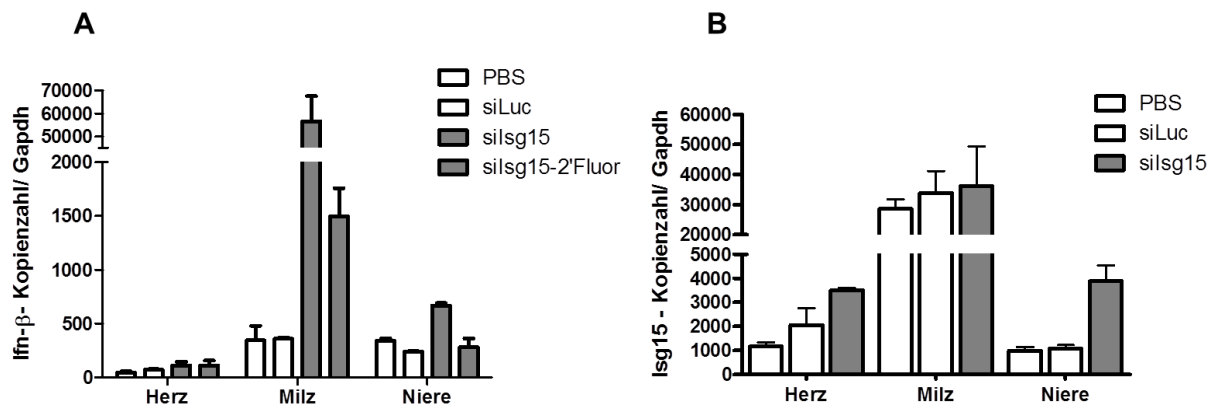
In der gesamten Leber war vom zweiten bis zum 10. Tag nach einmaliger Applikation ein signifikanter ( $p<0,0001$ ) Isg15 *Knockdown* detektierbar. Für die unmodifizierte siRNA (silsg15) betrug die durchschnittliche *Knockdown* Effizienz in diesem Zeitraum:  $86,4\%\pm 2,9$  (Mittelwert±SEM), für die methylierte Sequenz (silsg15-2'O-Methyl)  $80,2\%\pm 8,3$  (Mittelwert±SEM) und für die fluorierte Variante (silsg15-2'Fluor)  $81,1\%\pm 3,1$  (Mittelwert±SEM) (Abb.3.2.3). Dieses Experiment zeigt, dass *in vivo*, genau wie *in vitro*, die unterschiedlichen Ribose-Modifikationen nur einen marginalen Effekt auf die *Knockdown* Effizienz der siRNA haben, sowie einen stabilen über mindestens 10 Tage möglichen *Knockdown* nach einmaliger Applikation erzielen.

Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils wurde beschrieben, dass eine initiale, vorübergehende, MyD88-anhängige Induktion des Immunsystems sechs Stunden nach Applikation der siRNA auftritt. Aus diesem Grund wurde auch für die verschiedenen Isg15-spezifischen siRNAs die Expression verschiedener Immunmarker 6h nach Applikation ermittelt.



**Abb.3.2.4 Die Ribose-Modifikationen der Isg15 siRNA verhindern *off-target* Effekte in der Leber.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g), die Isg15-spezifischen siRNAs, sowie die siLuc und PBS als Kontrollen, durch eine Injektion in die Schwanzvene. Die Leberentnahme erfolgte 6h nach der Injektion. Die RNA wurde extrahiert und die Genexpression von Ifn-β mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

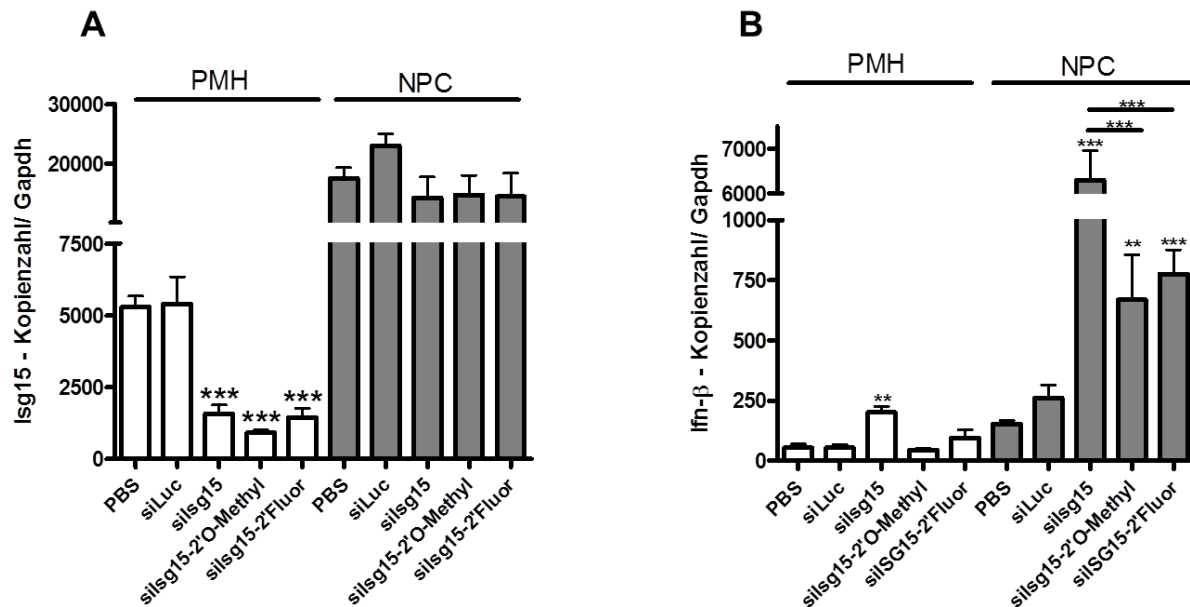
Anhand der Ifn-β Expression konnte in Abb.3.2.4 exemplarisch gezeigt werden, dass die nicht modifizierte siRNA (silsg15) eine signifikante ( $p<0,0001$ ) Erhöhung der Ifn-β mRNA induzierte. Die methylierte und die fluoridierte siRNA wies keine Induktion einer Immunantwort auf. Als Kontrolle wurde hier die in Teil I etablierte methylierte siLuc verwendet sowie unbehandelte Tiere und PBS injizierte C57BL/6 Mäuse. Da sich unbehandelte und PBS injizierte C57BL/6 Mäuse nicht unterschieden, ist im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur eine der beiden Gruppen als Kontrolle dargestellt.



**Abb.3.2.5 Die systemische Wirkung der siRNAs *in vivo*.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200 $\mu$ l der LNP01-formulierten siRNA (4 $\mu$ g/g), die Lsg15-spezifischen siRNAs, sowie die siLuc und PBS als Kontrollen, durch eine Injektion in die Schwanzvene. Die Organentnahme (Herz, Milz, Niere) erfolgte 6h (A) und 48h (B) nach Injektion. Die RNA wurde extrahiert und die Genexpression von Ifn- $\beta$  (A) und Lsg15 (B) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte $\pm$ SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

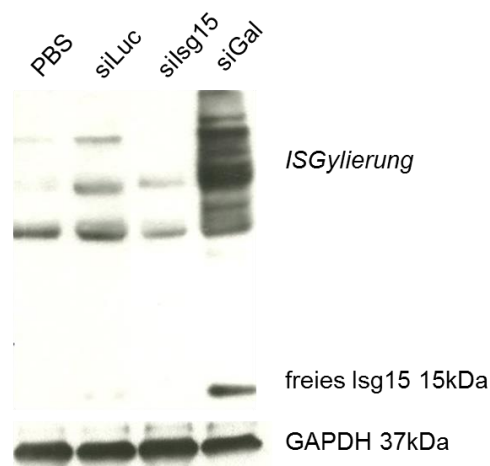
Die Immunreaktion, ausgelöst durch siLsg15 6h nach Applikation, war auch in Milz und Niere zu detektieren und stellte somit eine systemische Immunantwort dar, gemessen an der Ifn- $\beta$  Expression (Abb.3.2.5.A). In keinem anderen Organ (Milz, Herz oder Niere) war nach 48h ein Lsg15 *Knockdown* detektierbar (B).

Um zu untersuchen, welche Leberzelltypen von den LNP01 formulierten siRNAs erreicht werden, wurden primäre murine Hepatozyten (PMH) und ein Mix aus NPCs, 6h bzw. 48h nach siRNA Applikation aus C57BL/6 Mäusen isoliert, RNA extrahiert und die Genexpression von Lsg15 und Ifn- $\beta$  mittels qRT-PCR ermittelt.



**Abb.3.2.6 Hepatozyten und NPC reagieren unterschiedlich auf die LNP01-formulierten siRNAs *in vivo*.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g), die Isg15-spezifischen siRNAs, sowie die siLuc und PBS als Kontrollen, durch eine Injektion in die Schwanzvene. Die PMH und NPC wurden 48h (A) und 6h (B) nach Injektion isoliert, die RNA extrahiert und die Genexpression von Isg15 (A) und Ifn-β (B) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Die Abb.3.2.6.A zeigt den Hepatozyten spezifischen *Knockdown* von Isg15, 48h nach Applikation. Im ersten Teil dieser Arbeit wird schon beschrieben, dass eine initiale, vorübergehende, Myd88-anhängige Induktion des Immunsystems 6 Stunden nach Applikation der siRNA auftrat und dass diese *off-target* Effekte, hier gemessen an der Ifn-β Expression, NPC abhängig sind. Die Abb.3.2.6.B zeigt, dass dies auch für die Isg15-spezifischen siRNAs gilt. Die siRNA silsg15 ohne Ribose-Modifikation induziert sogar in den PMH die Ifn-β Expression. In den NPC zeigte sich, dass durch die Ribose-Modifikationen der siRNAs silsg15-2'O-Methyl und silsg15-2'Fluor, die Induktion der Ifn-β Expression im Vergleich zur silsg15 signifikant reduziert war.



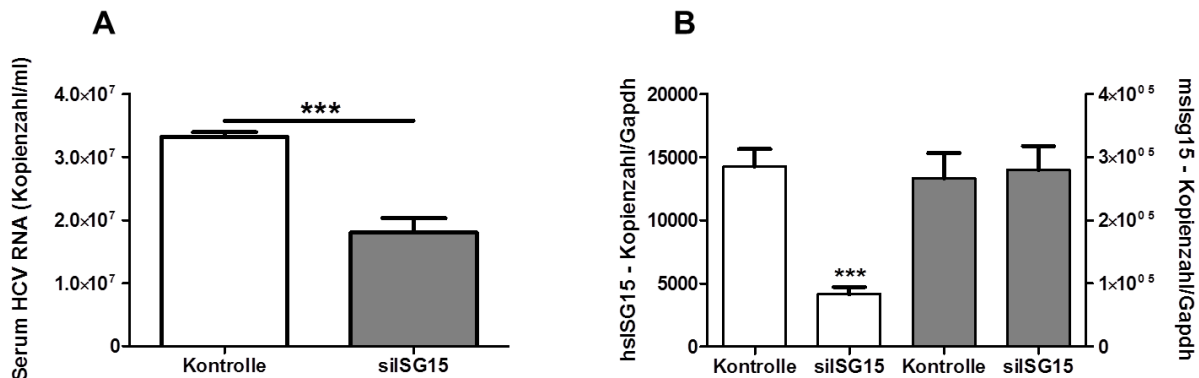
**Abb.3.2.7 Das Isg15 Protein ist nach der Gabe von silsg15 reduziert.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene, die Isg15-spezifische siRNA, sowie die siLuc und PBS als negative Kontrollen, siGal als positive Kontrolle,. Die PMH wurden 48h nach Injektion isoliert, Gesamtprotein extrahiert und 30µg per Western Blot analysiert.

Mittels Western Blot Analyse wurde der Isg15 *Knockdown* in den PMH auf Proteinebene validiert. Die Verwendung von silsg15 führte zu einer Reduktion der ISGylierung im Vergleich zur siLuc. Als Positivkontrolle wurde die immunaktivierende siGal eingesetzt, die eine starke ISGylierung und als einzige auch freies Isg15 (15kDa) induzierte (Abb.3.2.7).

### 3.2.2 Anwendung der LNP01-formulierten siRNA in humanisierten chimären Mäusen

Das einzig verfügbare replizierende HCV Mausmodell besteht momentan aus immundefizienten (uPA/SCID) Mäusen mit humanisierten Lebern. Das bedeutet, die murinen Hepatozyten sterben gezielt ab und werden durch gesunde humane Hepatozyten ersetzt (Yoshizato *et al.* 2012). Nach dieser Repopulation der Leber ist es möglich, diese Tiere bzw. die humanen Hepatozyten mit HCV (Mercer *et al.* 2001) oder HBV (Dandri *et al.* 2001) zu infizieren. Die Firma PhoenixBio Co. (Hiroshima, Japan) bietet die Generierung und Untersuchung solcher Tiere kommerziell an. Die humanisierten Mäuse werden als PXB Mäuse bezeichnet („PhoenixBio® (uPA+/+/SCID) Humanized Liver Chimeric Mouse Model“). Die Züchtung, Haltung und Generierung der Tiere, die Infektion mit HCV, die Applikation der siRNAs, die

Blutabnahme und –Analyse, sowie die Gewebeentnahme sind von der Firma PhoenixBio Co. durchgeführt worden. Die HCV-RNA-Kopienzahlen im Serum wurden regelmäßig überprüft. Fünf Tage nach Applikation der humanen ISG15-spezifischen siRNA (siISG15), sowie der entsprechenden Kontrolle, wurde humanes und murines Lebergewebe entnommen. Die RNA Isolation und die Durchführung der qRT-PCR wurden am Uniklinikum Essen durchgeführt.

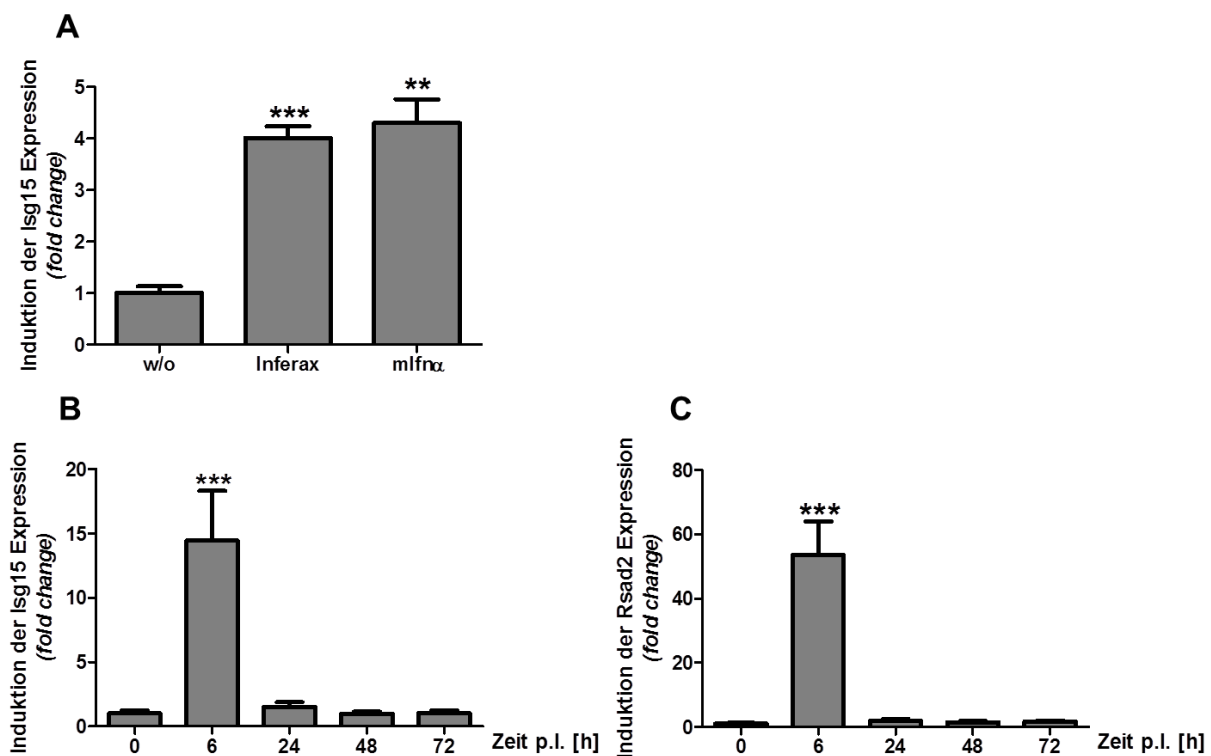


**Abb.3.2.8 Nanolipid-formulierte (LNP01) siISG15 supprimiert die HCV-Replikation in humanisierten, HCV-infizierten Mäusen.** Humanisierte, HCV-infizierte PXB Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g), die ISG15-spezifische siRNA, sowie die siLuc und PBS als Kontrollen, durch eine Injektion in die Schwanzvene. Es erfolgte die Blutabnahme 4 Tage nach der siRNA Applikation und Kontrolle der HCV-RNA im Serum (Mittelwerte±SEM) (A). Die Leberentnahme erfolgte 5 Tage nach Injektion. Die RNA wurde extrahiert und die Genexpression von humanem hslsg15 (weiße Balken) und murinem mslsg15 (graue Balken) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM) (B). Die Kontrollgruppe bestand aus unbehandelten (w/o) und siLuc behandelten Mäusen. \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Die Analysen im Serum ergaben eine signifikante ( $p<0,0001$ ) Reduktion der HCV-RNA am 4. Tag nach der Applikation der spezifischen, humanen ISG15 siRNA (Abb.3.2.8.A). Die Analyse der hepatischen ISG15-Level dieser Tiere zeigte den signifikanten ( $p>0,0001$ ) ISG15 *Knockdown* (humanes ISG15 = hslsg15; weiße Balken) in den humanen Hepatozyten der PXB Mäuse (n= 3 Tiere), die Expression von murinem lsg15 (murines lsg15 = mslsg15; graue Balken) blieb aufgrund mangelnder Sequenz-Homologie unverändert (B).

### 3.2.3 Der Isg15 *Knockdown* verstärkt die Immunantwort auf exogenes Interferon *in vivo*

Um zu untersuchen, ob Isg15 auch *in vivo* eine regulatorische Rolle in der Interferon Antwort spielt, wurde zunächst getestet, welche therapeutischen Interferone auch in der Maus reaktiv sind. Hierzu wurden murine Hepatozyten mit therapeutisch eingesetztem Ifn- $\alpha$  sowie murinem Ifn- $\alpha$  (mlfn- $\alpha$ ) stimuliert, bzw. es wurden C57BL/6 Mäuse mit 600IU/g Körpergewicht Inferax i.v. injiziert und im Zeitverlauf mittels qRT-PCR die Antwort in Form der Isg Expressionen ermittelt.



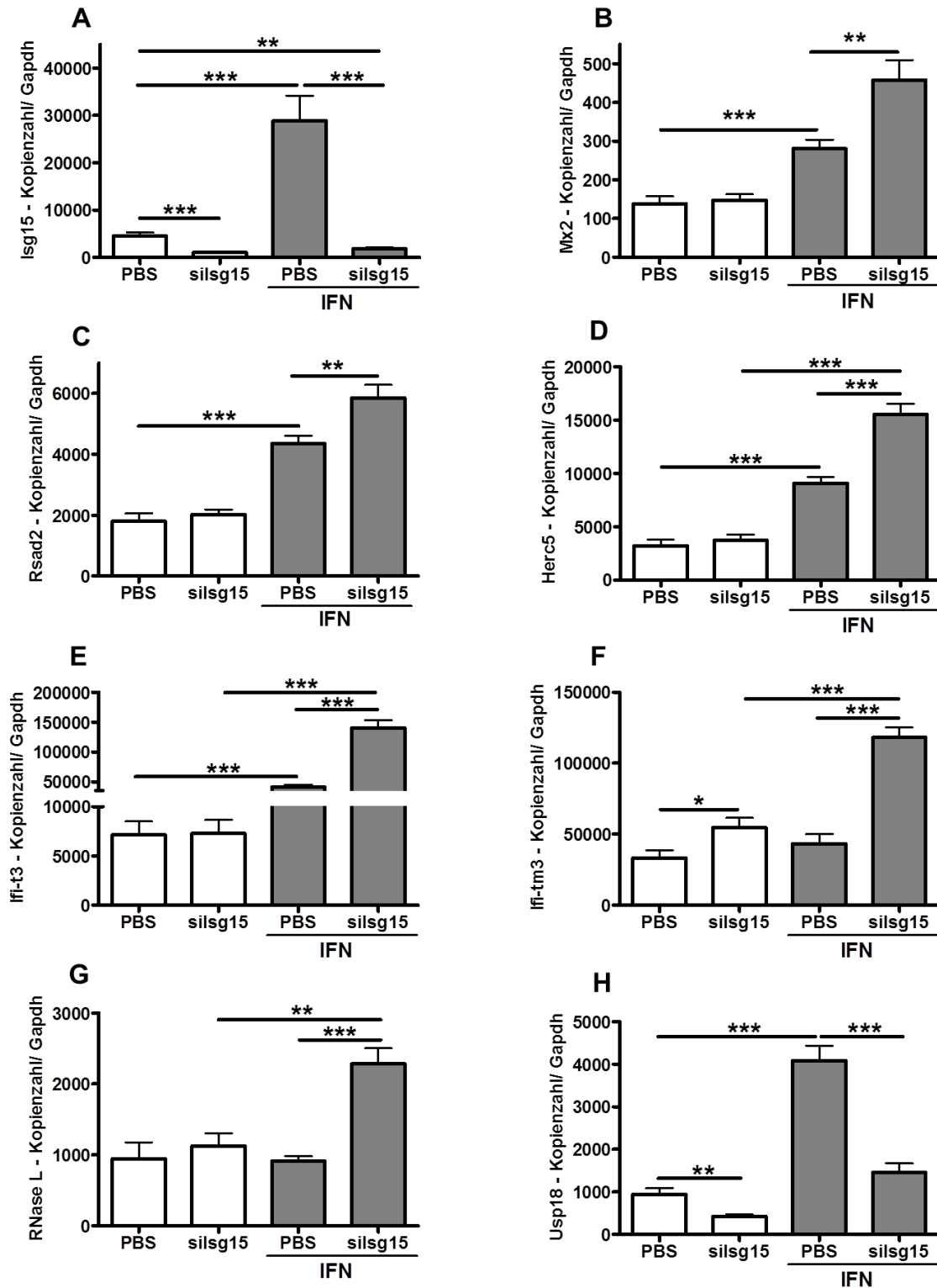
**Abb.3.2.9 Die induzierte ISG Expression nach der Behandlung mit IFN *in vitro* und *in vivo*.** PMH wurden aus 7 Wochen alten, männlichen C57BL/6 Mäusen isoliert und mit Inferax oder mit murinem IFN- $\alpha$  [10,000U/ml] für 6h stimuliert *in vitro* (A). 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200 $\mu$ l des IFN- $\alpha$  [600 IU/g Körpergewicht] durch eine Injektion in die Schwanzvene. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0-72h) wurden die Lebern entnommen (B, C). Es wurde die RNA aus dem Lebergewebe und den PMH isoliert und Veränderungen in der Genexpression von Isg15 (A, B) und Rsad2 (C) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin/Gapdh normalisiert (Mittelwerte $\pm$ SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Es stellte sich heraus, dass *in vitro* in PMH, Consensus Interferon (Inferax, Astellas Pharma, München) die Isg15 Expression genauso induziert wie murines Interferon alpha (Abb.3.2.9.A). Die anderen verwendeten IFN (Pegasys®, PegIntron®, Roferon®-A und rekombinantes IFN- $\alpha$ A/D) hatten keinen vergleichbar starken Effekt



in den PMH, daher sind die Daten hier nicht dargestellt. *In vivo* wurde auf Grund dieser Ergebnisse nur Inferax appliziert, welches im gesamten Lebergewebe auch die Expression von Isg15 und Rsad2 induzierte. Diese Induktion war jedoch zeitlich begrenzt und nur in der frühen Phase (6h) nach Applikation zu detektieren (B und C).

Inferax wurde nun mit 600IU/g Körpergewicht appliziert, 10 Tage nachdem die C57BL/6 Mäuse mit silsg15-2'Fluor behandelt worden waren. Die Gewebeentnahme erfolgte 6h nach der Inferax Applikation.



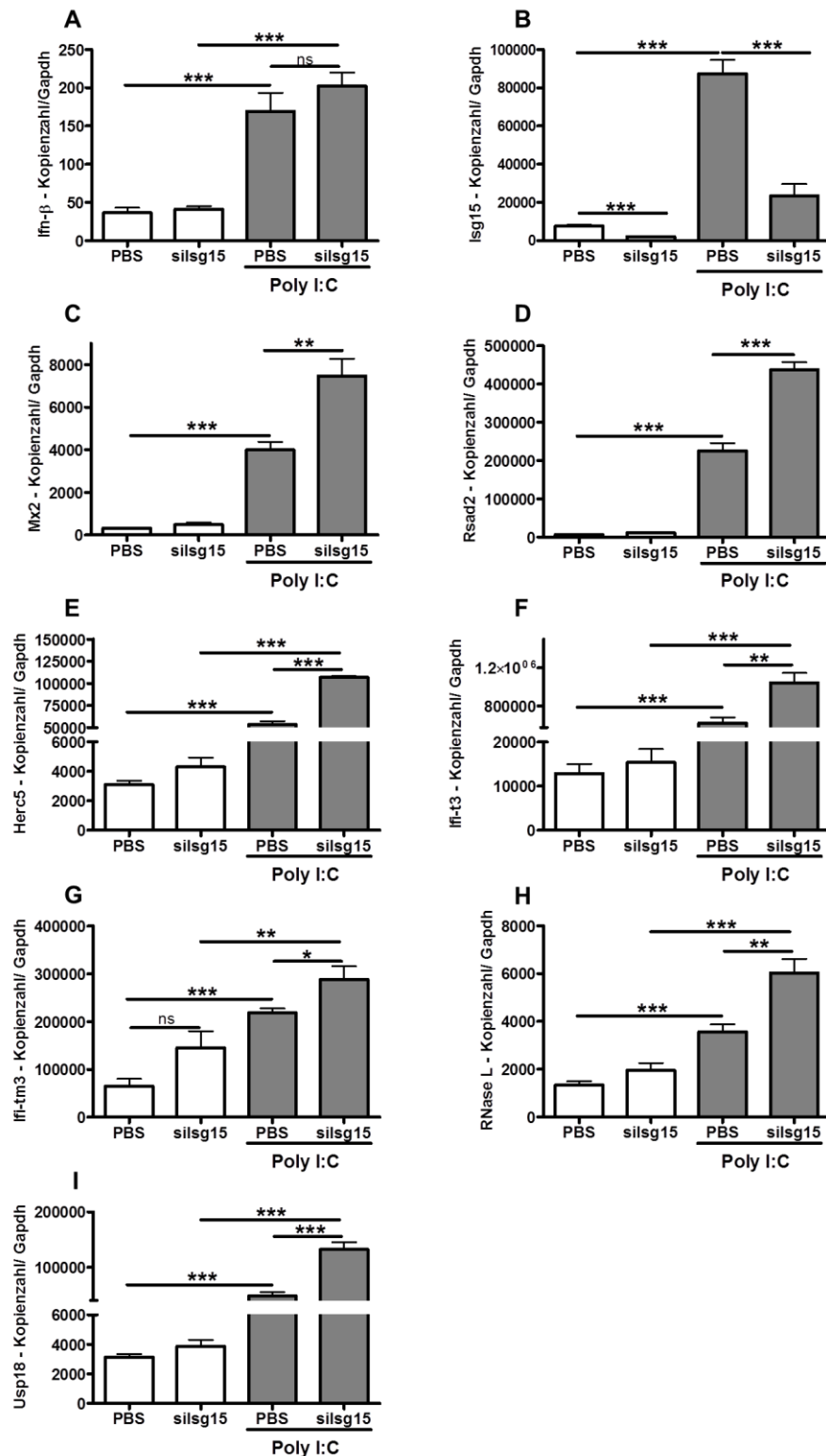
**Abb.3.2.10 Der Isg15 Knockdown verstärkt die Immunantwort auf exogenes Interferon *in vivo*.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (silsg15-2'Fluor) (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Nach 10 Tagen erhielten diese Mäuse zusätzlich i.v. IFN. 6h nach der zweiten Injektion wurden die Lebern entnommen. Die RNA wurde aus dem Lebergewebe isoliert und Veränderungen in der Genexpression von Isg15 (A), Mx2 (B), Rsad2 (C), Herc5 (D), Ifi-t3 (E), Ifi-tm3 (F), RNaseL (G) und Usp18 (H) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert und mit den unbehandelten Kontrollen verglichen (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Die qRT-PCR Analysen des totalen Lebergewebes ergaben einen effizienten Isg15 *Knockdown* mit  $81,9\% \pm 2,0$  (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p=0,003$ ) verglichen mit der PBS Kontrolle. Die Inferax Injektion induzierte eine  $7,0 \pm 1,4$  ( $p=0,0005$ ) fach erhöhte Isg15 Expression, es konnte aber gezeigt werden, dass der Isg15 *Knockdown* trotz Interferon Behandlung sehr effizient funktionierte, verglichen mit PBS/IFN lag die *Knockdown* Effizienz bei  $94,3\% \pm 1,2$  (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p=0,0002$ ). Auch im Vergleich zur basalen Isg15 Expression (PBS Kontrolle) lag der *Knockdown* bei  $60,0\% \pm 8,2$  (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p=0,0045$ ) (Abb.3.3.10.A). Um die Antwort auf das exogene Interferon zu bestimmen, wurde die Expression folgender ISGs mittels qRT-PCR analysiert: Mx2 (*Myxovirus resistance 2*), Rsad2 (*radical S-adenosyl methionine domain containing 2*), Herc5 (*HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5*), Ifi-t3 (*interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3*), Ifi-tm3 (*interferon induced transmembrane protein 3*), RNaseL (*ribonuclease L*) und Usp18 (*ubiquitin specific peptidase 18*) (B-H).

Die Expression von Mx2, Rsad2, Ifi-t3, Herc5 und Usp18 in der Leber wurde durch die Interferon Injektion signifikant gesteigert im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu konnte die Expression von RNaseL und Ifi-tm3 durch die alleinige Gabe des Interferons nicht induziert werden. In der Kombination silsg15-2'Fluor plus IFN war die Expression aller Gene, mit Ausnahme von Usp18, signifikant erhöht, verglichen mit der alleinigen IFN Behandlung. Die Expression von Usp18, einer Isg15-spezifischen Peptidase und Regulator des Jak/STAT Signalweges (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) (Randall et al. 2006) war nach der Isg15 Suppression signifikant reduziert, sowohl in der Kontroll- als auch der IFN-behandelten Gruppe (H).

### **3.2.4 Der Isg15 *Knockdown* begünstigt die Immunantwort auf endogenes Interferon *in vivo***

Als nächstes schließt sich die Untersuchung der Immunantwort auf endogenes IFN an. Zu diesem Zweck wurde die Expression von Ifn- $\beta$  und verschiedenen ISGs 6h nach der i.v. Applikation von PolyI:C ( $4\mu\text{g/g}$  Körpergewicht) mittels qRT-PCR analysiert, nachdem den C57BL/6 Mäusen 2 Tage zuvor die silsg15-2'Fluor ( $4\mu\text{g/g}$  Körpergewicht) verabreicht wurde.

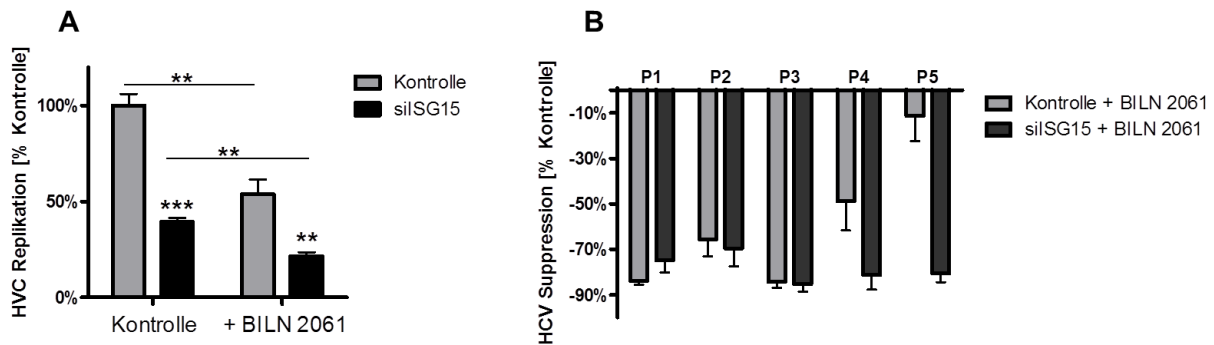


**Abb.3.2.11 Der Isg15 Knockdown verstärkt die Immunantwort auf endogenes Interferon *in vivo*.** 7 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse erhielten 200 $\mu$ l der LNP01-formulierten siRNA (silsg15-2'Fluor) (4 $\mu$ g/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Nach 48h erhielten diese Mäuse zusätzlich i.v. PolyI:C. 6h nach der zweiten Injektion wurden die Lebern entnommen. Die RNA wurde aus dem Lebergewebe isoliert und Veränderungen in der Genexpression von Ifn- $\beta$  (A), Isg15 (B), Mx2 (C), Rsad2 (D), Herc5 (E), Ifi-t3 (F), Ifi-tm3 (G), RNaseL (H) und Usp18 (I) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert und mit den unbehandelten Kontrollen verglichen (Mittelwerte $\pm$ SEM). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

Als TLR3 Ligand induziert PolyI:C die Expression von endogenem Ifn- $\beta$  in der Leber, diese unterschied sich nicht zwischen den Isg15-supprimierten Tieren und der Kontrollgruppe ( $p=0,2786$ ) (Abb.3.2.11.A). Die PolyI:C Injektion führte zu einem  $11.5\pm 0,9$  ( $p<0,0001$ ) fachen Anstieg der Isg15 Expression in der PBS-Gruppe. Der siRNA-vermittelte Isg15 *Knockdown* unter PolyI:C Behandlung erreichte  $63,8\%\pm 10,9$  ( $p=0,0008$ ) verglichen zur PBS/PolyI:C-Gruppe (B). Im Gegensatz zum exogenen IFN führte die PolyI:C Behandlung zu einer signifikanten Induktion aller gemessenen ISGs (Mx2, Rsad2, Ifi-t3, RNaseL, Ifi-tm3, Herc5 und Usp18 (C-I)). Allerdings war auch in diesem Experiment die Immunantwort auf das endogene IFN in Isg15-supprimierten Tieren für alle diese ISGs, inklusive Usp18 (I), verstärkt. Des Weiteren war generell die Immunantwort auf endogene IFN stärker ausgeprägt als die Antwort auf das pharmakologisch verabreichte, exogene IFN.

### **3.2.5 Der Isg15 *Knockdown* unterstützt die Interferon-freie HCV Behandlung**

Die Behandlung von HCV wird in Studien mit DAA (*direct-acting antivirals*) durchgeführt, in Kombination mit IFN oder anderen DAAs, aber mit dem Ziel der IFN-freien Behandlung (*IFN-free regiments*). Der Nachteil der DAAs, die eine direkt Inhibierung der viralen Replikation bewirken, ist, dass schnell Resistenzen ausgebildet werden, indem das Virus mutiert. Der Serin-NS2-3-Protease Inhibitor (PI), BILN 2061, als Ciluprevir von der Firma Boehringer Ingelheim entwickelt, stand unserem Labor für experimentelle Zwecke zur Verfügung. Zunächst wurde die  $IC_{50}$  [0.2nM] für die HCV subgenomischen Replikon Zelllinien ermittelt. Mit dem folgenden Experiment konnte dann gezeigt werden, dass sich therapeutische Vorteile ergeben, wenn man die siIsg15 in Form einer IFN freien Behandlung mit einem DAA kombiniert.



**Abb.3.2.12 Therapeutische Optionen für den ISG15 *Knockdown*.** Humane con1 Zellen wurden mit BILN 2061 in der IC<sub>50</sub> Konzentration behandelt. Nach jeder Passage wurden die Zellen, mit 5nM siRNA (siNC, siSG15) transfiziert. Es wurden Zellaliquots für die RNA Isolation verwendet, gefolgt von einer qRT-PCR um die HCV-Replikation zu detektieren. Der ISG15 *Knockdown* in Kombination mit dem Protease Inhibitor, verursachte einen synergistischen Effekt (A) und verhinderte die Entwicklung von Resistenzen (B). Die Kontrollgruppe bestand aus unbehandelten (w/o) und siNC behandelten Zellen. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin normalisiert (Mittelwerte $\pm$ SEM). \*:p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001

Nach einmaligem Einsatz des PI (BILN 2061 [0.2nM]) war die HCV-Replikation um 46,2% $\pm$ 7,5 (Mittelwert $\pm$ SEM) supprimiert, wohingegen der Isg15 *Knockdown* zu einer 60,6% $\pm$ 2,2 (Mittelwert $\pm$ SEM) Suppression der HCV-Replikation führte (Abb.3.2.12.A). Die Kombination von Isg15 *Knockdown* und PI Behandlung führte zu einem synergistischen Effekt in der HCV Suppression von 78,3% $\pm$ 2,0 (Mittelwert $\pm$ SEM; p<0.01). Im Langzeitexperiment wurden die HCV subgenomische Hepatomzellen nach jeder Passage mit Isg15-spezifischer siRNA, bzw. der Kontroll-siRNA, in Anwesenheit von BILN 2061 [0.2nM] transfiziert, wobei ein Anteil der Zellen für die RNA Isolationen verwendet wurde. Mittels qRT-PCR wurde die HCV-Replikation bestimmt. In Passage 1 erreichte der PI kombiniert mit Kontroll-siRNA oder mit Isg15-spezifischen siRNA 83,8% $\pm$ 1.9 bzw. 74,8% $\pm$ 5.4 (Mittelwert $\pm$ SEM). Nach der 4. Passage führte die Kombination PI plus Kontroll-siRNA zur Resistenz, die HCV-Replikation war nur noch um 48,8% $\pm$ 12,9 (Mittelwert $\pm$ SEM) supprimiert, während nach der 5. Passage nur noch eine 11,4% $\pm$ 11,0 (Mittelwert $\pm$ SEM) Suppression erreicht werden konnte. Im Gegensatz dazu führte die Kombination von Isg15 *Knockdown* und dem Protease Inhibitor in den Passagen vier und fünf zu 81,2% $\pm$ 6,4 (Mittelwert $\pm$ SEM) bzw. 80,6% $\pm$ 3,9 (Mittelwert $\pm$ SEM) (B). Dieses Ergebnis impliziert, dass der Isg15 *Knockdown* die Resistenzentwicklung während der Behandlung mit Protease Inhibitoren verzögern kann.

### 3.3 Identifikation von Isg15 abhängigen Proteinen

Diese Daten sind Teil der Publikation „*Identification of proteins that mediate the pro-viral functions of the Interferon stimulated gene 15 in Hepatitis-C-Virus replication*“ (Real *et al.* 2013).

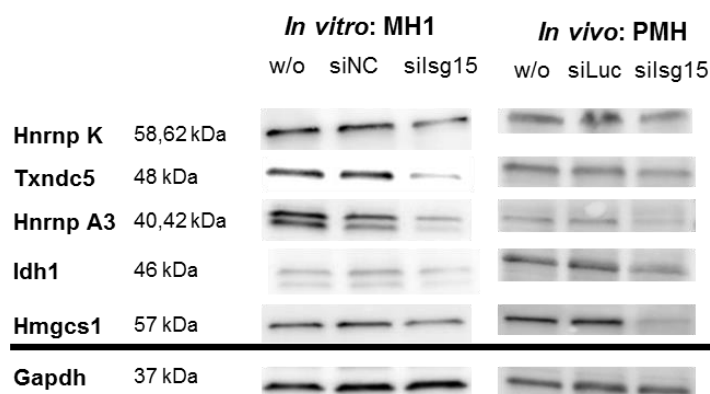
#### 3.3.1 Funktionelle Charakterisierung des Isg15-Effekts

Es ist seit 1979 bekannt, dass Isg15, ähnlich wie Ubiquitin, an viele zelluläre Proteine bindet (Dao & Zhang 2005). Die detaillierten Funktionen werden nun nach und nach aufgeklärt. Bis heute konnte nicht gezeigt werden, ob Isg15 direkt mit Komponenten des Hepatitis-C-Virus interagiert, oder ob die Interaktion indirekt über verschiedene Signalwege stattfindet.

Um die Rolle des Isg15 im Rahmen der HCV-Replikation genauer zu charakterisieren und mögliche Interaktionspartner zu identifizieren, wurden Proteomanalysen durchgeführt. Hierzu wurden *in vitro* die murinen HCV Replikon Zellen mit 5nM Isg15-spezifischer siRNA transfiziert und nach 24h zur Analyse verwendet. Im *in vivo* Ansatz wurden PMH aus silsg15-LNP01 gespritzten C57BL/6 Mäusen 48h nach Applikation isoliert. Bevor die Proteomanalysen durchgeführt wurden, wurde zunächst mittels qRT-PCR der Isg15 *Knockdown* in beiden Ansätzen und die HCV Suppression in den MH1 Zellen überprüft. Die erhaltenen Proteinproben wurden in der Arbeitsgruppe *Clinical Proteomics* von Frau Jun.-Prof. Dr. Barbara Sitek im Medizinischen Proteom-Center (MPC) der Ruhr-Universität Bochum weiter analysiert. Die Methoden für die Label freie Proteom Studie sind in folgenden Publikationen beschrieben (Poschmann *et al.* 2009; Megger *et al.* 2013; Perkins *et al.* 1999; Real *et al.* 2013). In MH1 sowie in den PMH wurden verschiedene Protein Expressionslevel nach Isg15 *Knockdown* im Vergleich zur Kontrollgruppe analysiert, diese bestand aus unbehandelten und mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen bzw. Mäusen. Die Schnittmenge aus beiden Studien identifizierte sieben, nach dem Isg15 *Knockdown* herunter regulierte Proteine: *Acyl-Coenzyme A dehydrogenase medium chain* (Acadm), *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3* (Hnrnp A3), *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (Hnrnp K), *Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase* (Hmgcs1), *Isocitrate dehydrogenase cytoplasmic* (Idh1), *Proteasome subunit alpha type 6* (Psmα6) und *Thioredoxin domain-containing protein 5* (Txndc5).

### 3.3.2 Validierung der Isg15-abhängigen Kandidaten aus der Proteom Studie

Um die Isg15-abhängigen sieben Kandidaten Proteine zu validieren, wurde die murine HCV subgenomische Hepatomzelllinie MH1 mit 5nM siRNA (silsg15, siNC) transfiziert. Totale RNA und Proteine wurden 24h nach Transfektion isoliert, des Weiteren bekamen 7 Wochen alte C57BL/6 Mäuse 200µl der LNP01-siRNA (silsg15, siLuc) (4µg/g Körpergewicht) mittels i.v. Injektion, die PMH Präparation erfolgte 48h danach, auch aus den PMH wurde Gesamt-RNA und Gesamtprotein isoliert.



**Abb.3.3.1 Analyse der Isg15-regulierten Gene in MH1 (*in vitro*) und PMH (*in vivo*) im Western Blot.** MH1 Zellen wurden mit 5nM siRNA (siNC, silsg15) transfiziert und nach 24h die Proteinexpression von Hnrnp K, Txndc5, Hnrnp A3, Idh1 und Hmgcs1 mittels Western Blot analysiert. PMH wurden 48h nach der siRNA Injektion (siLuc, silsg15) isoliert und ebenfalls auf die Proteinexpression dieser Kandidatengene untersucht.

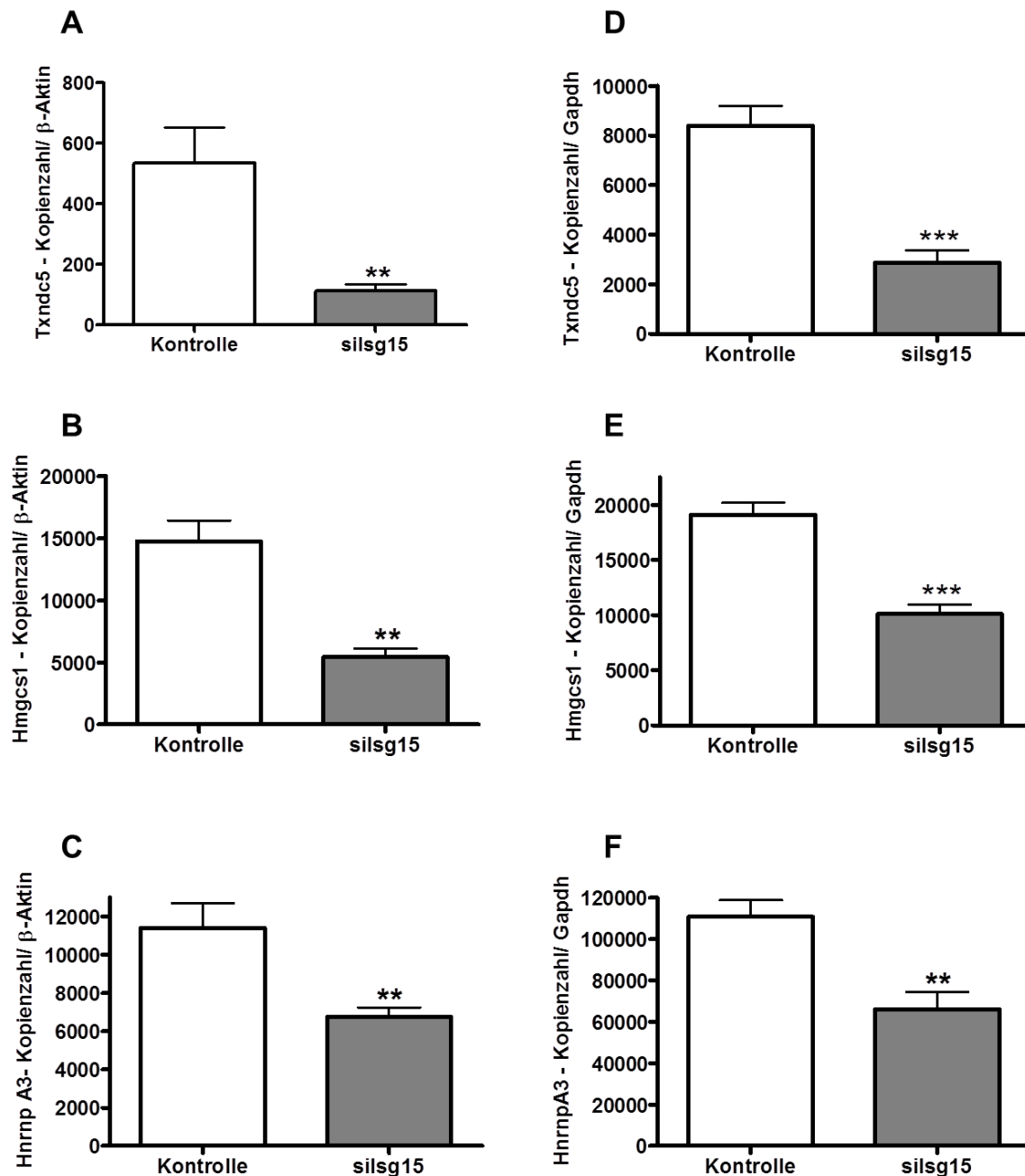
Western Blot Analysen von 30µg Gesamtprotein aus MH1 bzw. PMH konnten die Ergebnisse der Proteomstudien, d.h. die Reduktion von Hnrnp K, Txndc5, Hnrnp A3, Idh1 und Hmgcs1 in Isg15-supprimierten Zellen reproduzieren (Abb.3.3.1).

**Tabelle 3.2 Quantifizierung des Lichtsignals.**

Gene	<i>In vitro</i> : MH1 Suppression [%] (Mittelwert±SEM)	<i>In vivo</i> : PMH Suppression [%] (Mittelwert±SEM)
Hnrnp K	50,4 ± 1,6	39,4 ± 2,8
Txndc5	51,1 ± 2,6	40,0 ± 0,8
Hnrnp A3	59,8 ± 22,9	52,0 ± 11,6
Idh1	53,6 ± 0,3	25,0 ± 5,6
Hmgcs1	40,5 ± 3,7	45,3 ± 20,0

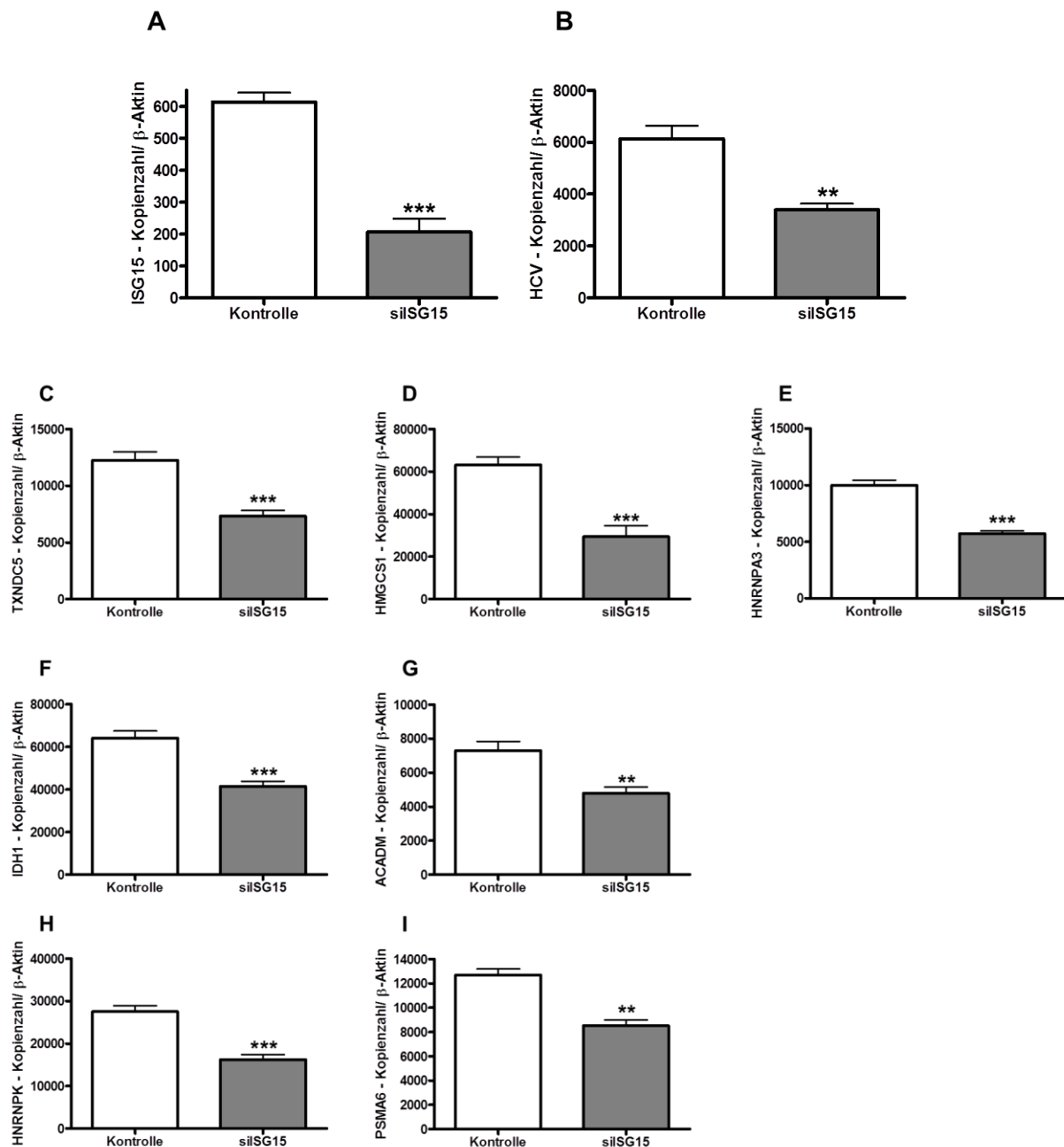


Mittels der Vilber Lourmat Fusion Software konnte die Intensität des Lichtsignals von den Western Blot Membranen quantifiziert und die Mittelwerte der Suppression inklusive SEM errechnet werden. (Tabelle 3.2).



**Abb.3.3.2 Analyse der Isg15-regulierten Gene in MH1 (*in vitro*) und PMH (*in vivo*) auf Transkriptionsebene.** MH1 Zellen wurden mit 5nM siRNA (siNC, silsg15) transfiziert und nach 24h die Expression von Txndc5 (A), Hmgcs1 (B) und Hnrnp A3 (C) mittels qRT-PCR ermittelt. PMH wurden 48h nach siRNA der Injektion (siLuc, silsg15) isoliert und ebenfalls auf die Expression der Kandidatengene Txndc5 (D), Hmgcs1 (E) und Hnrnp A3 (F) mittels qRT-PCR untersucht. Die Kontrollgruppe setzt sich aus unbehandelten (w/o) und siNC/siLuc behandelten Zellen/Mäusen zusammen. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin/Gapdh normalisiert (Mittelwerte $\pm$ SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Mittels qRT-PCR konnte die signifikante Reduktion folgender Gene auch auf Transkriptionsebene in Isg15 supprimierten Zellen, MH1 (A-C) sowie PMH (D-F), nachgewiesen werden: Txndc5, Hmgcs1 und Hnrnp A3 (Abb.3.3.2).

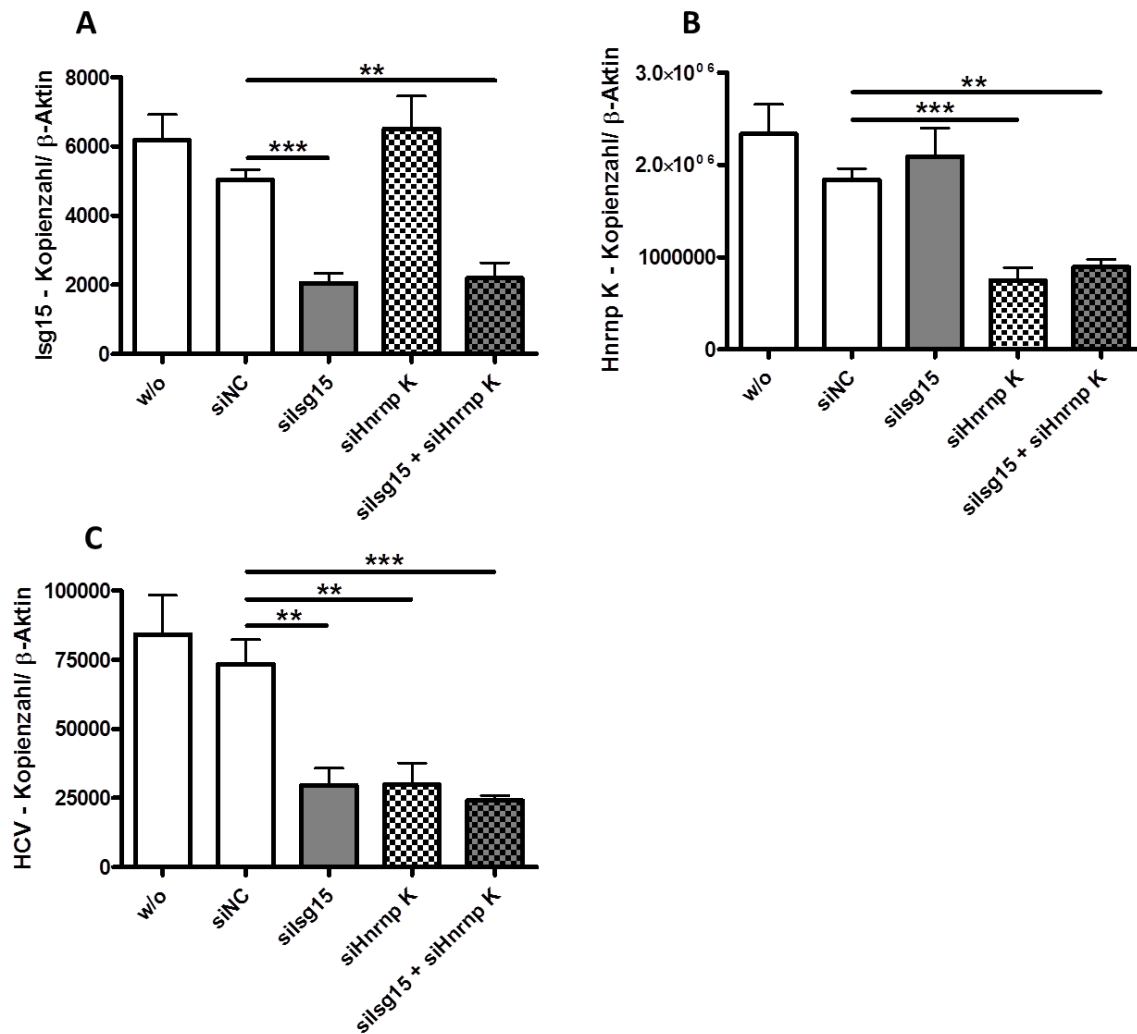


**Abb.3.3.3 Der Isg15 *Knockdown* reduziert die Transkription aller Kandidatengene im humanen Zellkultursystem.** Con1 Zellen wurden mit 5nM siRNA (siNC, silsg15) transfiziert. 24h (A, C-I) und 72h (B) nach der Transfektion wurde die RNA isoliert und die Expression von Isg15 (A), HCV (B) TXNDC5 (C), HMGCS1 (D), HNRNP A3 (E), IDH1 (F), ACADM (G), HNRNP K (H) und PSMA6 (I) mittels qRT-PCR ermittelt. Die Kontrollgruppe setzt sich aus unbehandelten (w/o) und siNC behandelten Zellen zusammen. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien β-Aktin normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

In ISG15 supprimierten (Abb.3.3.3.A) humanen subgenomischen HCV Replikon Zellen (con1) konnte auf Transkriptionsebene sogar eine signifikante Reduktion aller sieben Kandidaten (C-I) gezeigt werden, ebenfalls die Suppression der HCV-Replikation nach ISG15 *Knockdown* (B). Anschließend stellte sich die Frage, ob die sieben Kandidatenproteine einen direkten Effekt auf die HCV-Replikation haben. Hierzu wurden diese in murinen HCV Replikon Zellen mittels 10nM spezifischer siRNA supprimiert und der direkte Effekt auf HCV analysiert. Die *Knockdown* Effizienzen 24h nach der Transfektion und die Effekte auf die HCV-Replikation, 72h nach Transfektion, sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

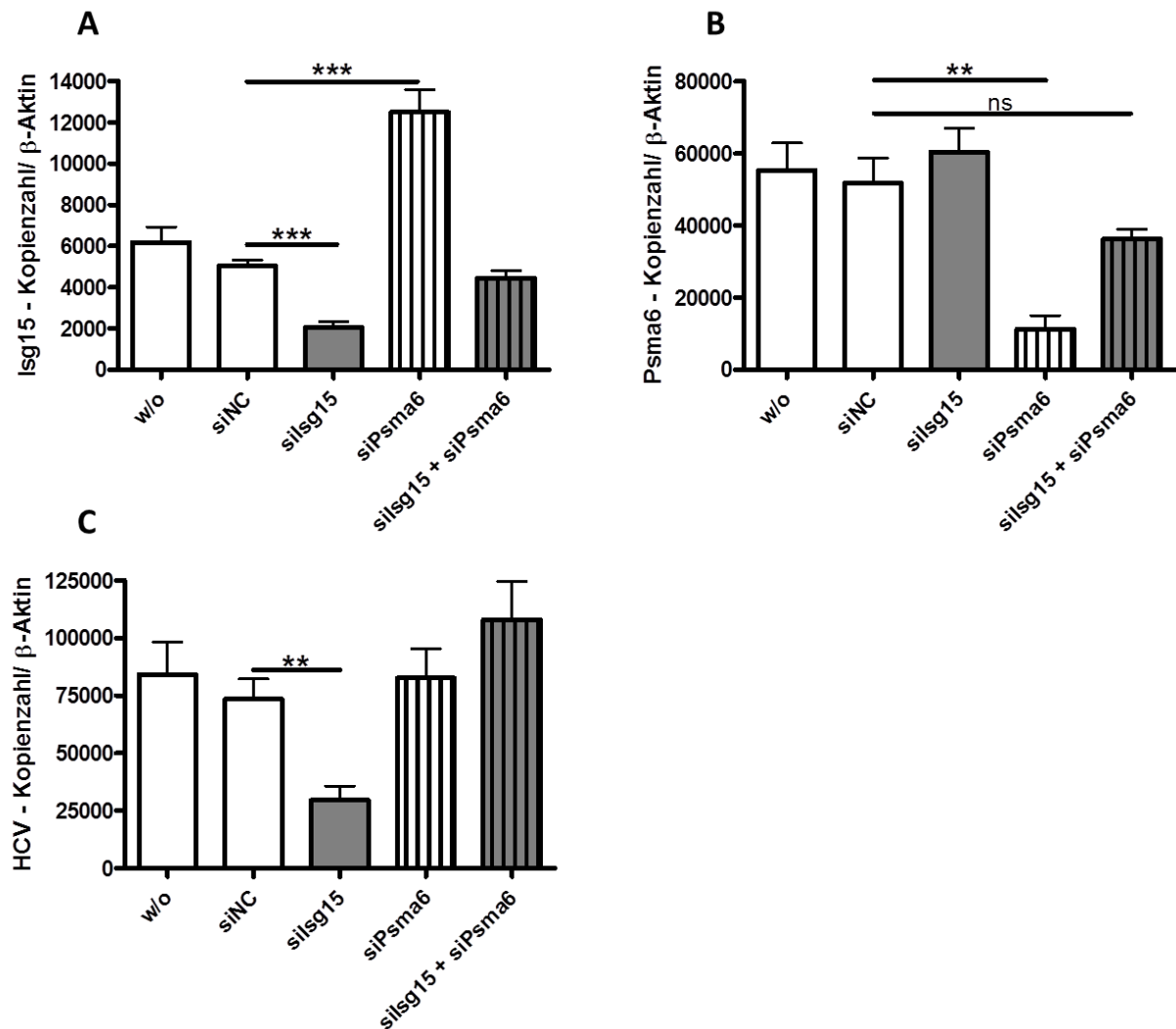
**Tabelle 3.3 *Knockdown* Effizienzen verschiedener siRNAs in MH1 Zellen.**

<b>Ziel Gen</b>	<b><i>Knockdown</i> Effizienz [%] (Mittelwert<math>\pm</math>SEM)</b>	<b>HCV Suppression [%] (Mittelwert<math>\pm</math>SEM)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Isig15</b>	<b>66,3 <math>\pm</math> 3,7</b>	<b>69,4 <math>\pm</math> 25,9</b>	<b>0,0001</b>
Hnrnp A3	56,4 $\pm$ 5,1	15,4 $\pm$ 2,2	0,65
Psma6	76,6 $\pm$ 5,4	1,2 $\pm$ 0,3	0,73
<b>Hnrnp K</b>	<b>72,9 <math>\pm</math> 4,0</b>	<b>55,3 <math>\pm</math> 2,5</b>	<b>0,0017</b>
Acadm	72,1 $\pm$ 8,3	18,2 $\pm$ 5,5	0,27
Hmgcs1	69,1 $\pm$ 4,7	4,6 $\pm$ 1,2	0,91
Idh1	74,3 $\pm$ 3,7	13,2 $\pm$ 3,3	0,41
Txndc5	73,7 $\pm$ 5,7	26,9 $\pm$ 4,9	0,18



**Abb.3.3.4 Der *Knockdown* von Hnrnp K supprimiert die HCV-Replikation.** MH1 Zellen wurden mit 10nM siRNA (siNC, siIsg15, siHnrnp K) transfiziert. 24h (A, B) und 72h (C) nach der Transfektion wurde die RNA isoliert und die Expression von Isg15 (A), Hnrnp K (B) und HCV (C) mittels qRT-PCR ermittelt. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin normalisiert (Mittelwerte $\pm$ SEM). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

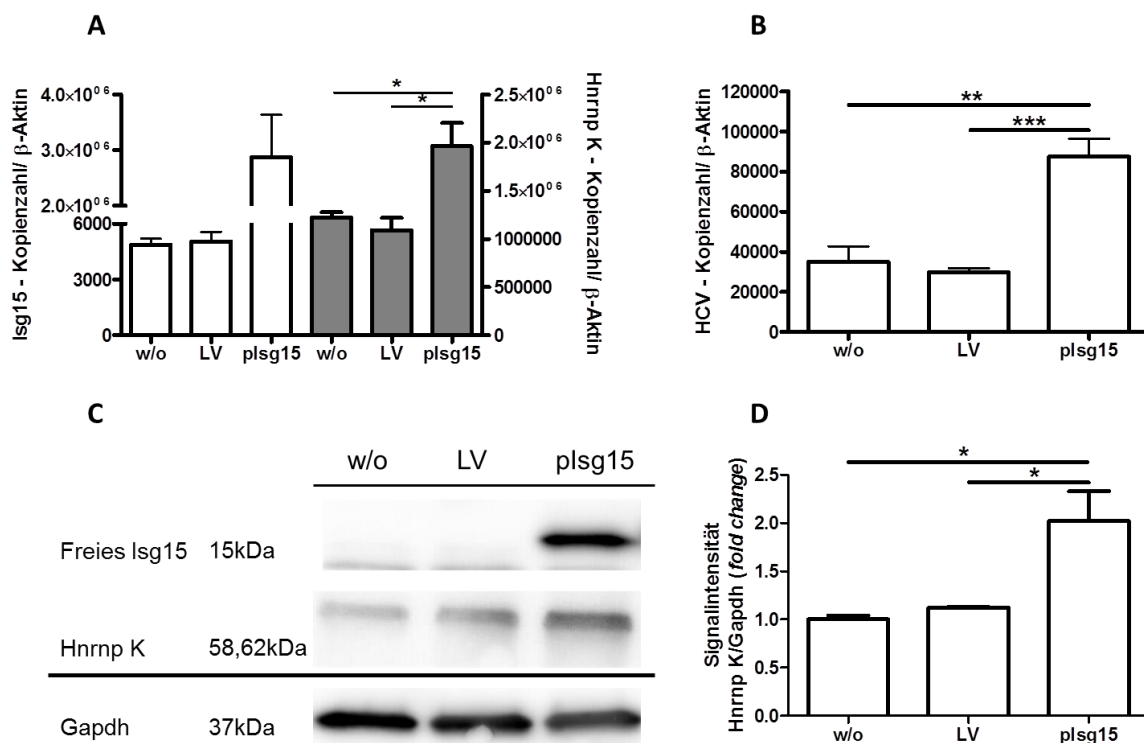
Es konnte gezeigt werden, dass neben dem siRNA-vermittelten Isg15 *Knockdown* auch der *Knockdown* von Hnrnp K einen signifikant supprimierenden Effekt auf die HCV-Replikation hatte (Abb.3.3.4.C). Die Suppression von Isg15 hat auf Hnrnp K auf Transkriptionsebene keinen Effekt (B). Der kombinierte Einsatz beider siRNAs (siIsg15 und siHnrnp K) führte zu gleichen *Knockdown* Effizienzen wie bei den Einzelbehandlungen (A und B). Das Gleiche galt auch für die Suppression der HCV-Replikation, hier war kein synergistischer Effekt zu beobachten (C). Die Isg15 Expression wurde nicht von dem Hnrnp K *Knockdown* beeinflusst (A).



**Abb.3.3.5 Psma6 reguliert die Isg15 Expression.** MH1 Zellen wurden mit 10nM siRNA (siNC, silsg15, siPsma6) transfiziert. 72h nach der Transfektion wurde die RNA isoliert und die Expression von Isg15 (A), Psma6 (B) und HCV (C) mittels qRT-PCR ermittelt. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin normalisiert (Mittelwerte $\pm$ SEM). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

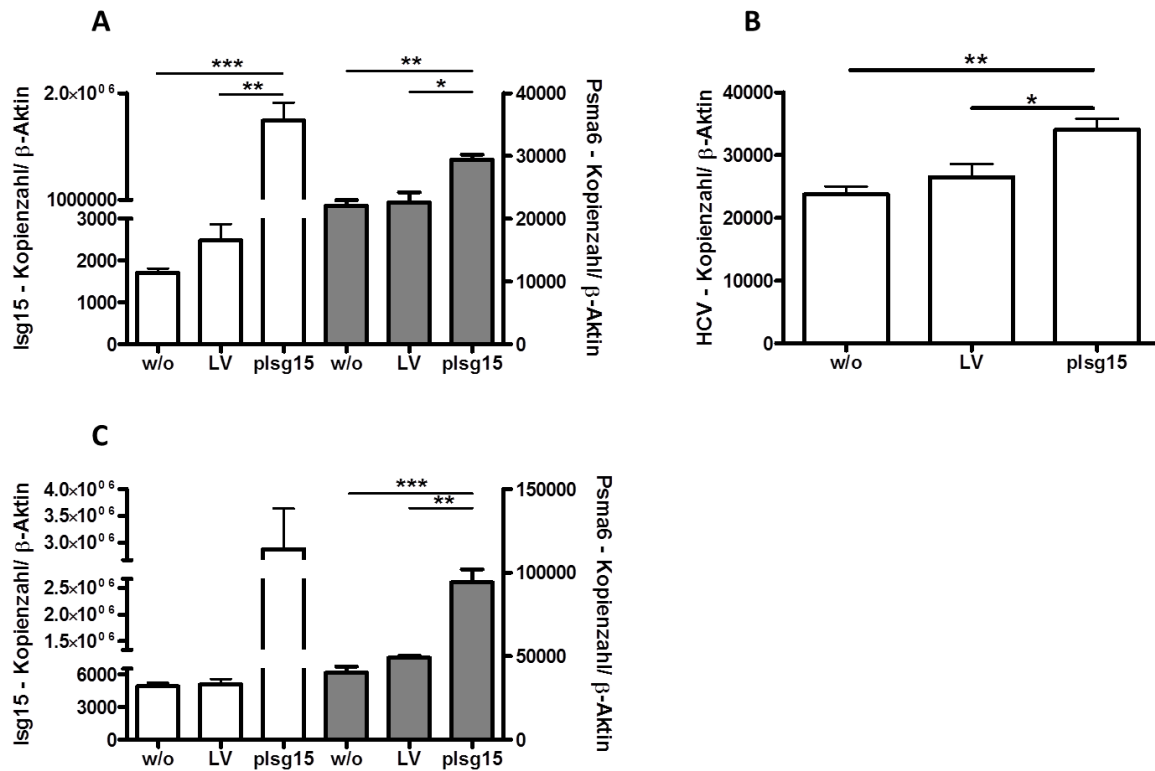
Für eines der identifizierten Kandidatenproteine, Psma6, konnte im murinen System (MH1) weder auf Transkriptions- (Abb.3.3.5.B) noch auf Proteinebene (siehe oben) ein suppressiver Effekt des Isg15 *Knockdowns* auf die Psma6 Expression validiert werden. Bei dem *Knockdown* der jeweiligen Kandidatengene mittels siRNA zeigte sich jedoch, dass der siRNA-vermittelte *Knockdown* von Psma6 nach 72h zu einer Isg15 Induktion führte (A). Der kombinierte Einsatz der beiden siRNAs (silsg15 und siPsma6) führte dazu, dass der suppressive Effekt der silsg15 siRNA aufgehoben wurde (A). Das Resultat war, dass der inhibierende Effekt der silsg15 auf die HCV-Replikation neutralisiert wurde (C).

Das vorangegangene Experiment hat den Effekt des Isg15 *Knockdowns* auf sieben mittels Proteomstudie identifizierte Proteine, sowohl auf Protein- wie auch RNA-Ebene validiert. Das nachstehend beschriebene Experiment dient zur Verifizierung des umgekehrten Effektes, der Überexpression des Isg15. Hierzu wurden murine HCV Replikon Zellen mit einem Isg15-Plasmid (plsg15: pCAGGS-6His-mlsg15) oder einem Leervektor (LV: pCAGEN) transfiziert (2.1.9). Der Vektor enthält einen eukaryotischen Promotor, welcher die Überexpression des enthaltenen Isg15 Gens ermöglicht. RNA und Gesamtprotein wurde 24h und 72h nach der Transfektion isoliert und mittels qRT-PCR bzw. Western Blot analysiert.



**Abb.3.3.6 Die Isg15 Überexpression führt zu einer Hnrnp K Induktion auf Transkriptions- und Translationsebene.** Murine HCV subgenomische Replikon Zellen wurden mit einem Isg15 enthaltenden Plasmid (plsg15: pCAGGS-6His-mlsg15) oder einem Leervektor (LV: pCAGEN) transfiziert. 72h nach Transfektion wurde RNA isoliert und die Genexpression von Isg15 (weiße Balken; A), Hnrnp K (graue Balken; A) und HCV (B) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien β-Aktin normalisiert (Mittelwerte±SEM). Gesamtprotein wurde nach 72h isoliert und 30µg per Western Blot analysiert (C). Die Auswertung erfolgte mittels densitometrischer Analyse von Hnrnp K/Gapdh (D).\*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Nach 72h Isg15 Überexpression war sowohl die Transkription von Hnrnp K (Abb.3.3.6.A) als auch die HCV-Replikation (B) gesteigert. Die Quantifizierung der Signalintensität des Western Blots (C) ergab auch für Hnrnp K eine 2-fach signifikant gesteigerte Expression nach Isg15 Überexpression.



**Abb.3.3.7 Die Isg15 Überexpression führt zu einer Psma6 Induktion auf Transkriptionsebene.** Murine HCV subgenomische Replikon Zellen wurden mit einem Isg15 enthaltenden Plasmid (plsg15: pCAGGS-6His-mlsg15) oder einem Leervektor (LV: pCAGEN) transfiziert. 24h (A, B) oder 72h (C) nach Transfektion wurde RNA isoliert und die Genexpression von Isg15 (weiße Balken; A, C), Psma6 (graue Balken; A,C) und HCV (B) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien β-Aktin normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Die Isg15 Überexpression führte nach 24h (Abb.3.3.7.A und B) und 72h (C) zu einer gesteigerten Expression von Psma6 (A und C) sowie einer erhöhten HCV-Replikation (B). Auf Proteinebene konnten diese Daten mittels Western Blot Analysen allerdings nicht validiert werden (nicht gezeigt).

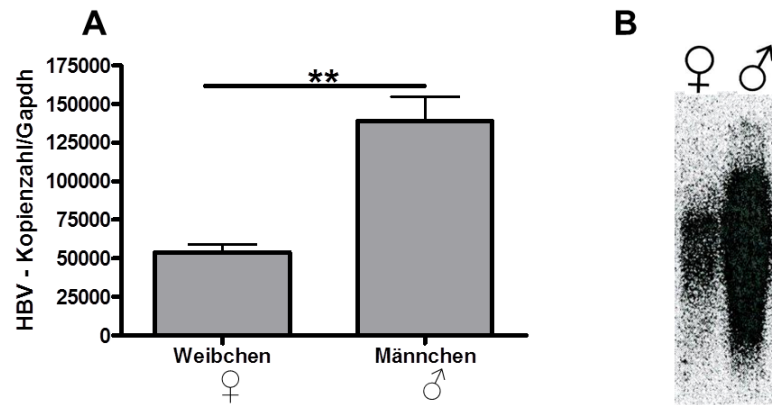
### **3.4 Charakterisierung von HBVtg Mäusen und Suppression der HBV-Replikation mittels siRNA**

Das Hepatitis-C-Virus ist ein RNA Virus, dessen Genom sich mit hohen Mutationsraten verändert (Ribeiro *et al.* 2012). Verwendet man eine siRNA direkt komplementär zum Virus, *in vitro* Daten hierzu sind publiziert (Xing *et al.* 2012), könnten sich schnell „resistente“ Subgruppen durchsetzen, die nicht mehr komplementär zur siRNA sind. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit der indirekte Weg der HCV-Suppression über den siRNA-vermittelten *Knockdown* von Wirtsfaktoren, wie Isg15 und Hnnp K, analysiert. Das Hepatitis-B-Virus ist ein DNA Virus, mit 100-1000-fach geringeren Mutationsraten als RNA Viren (Girones & Miller 1989), somit scheint die Behandlung einer Infektion mittels direkter siRNA Therapie erfolgsversprechender. Bei den im nachfolgenden Abschnitt als „HBV transgene Mäuse (HBVtg)“ benannten Tieren handelt es sich um das HBV transgene Mausmodell Tg1,4HBV-s-mut(3), beschrieben von Halverscheid *et al.* (Halverscheid *et al.* 2008). Da die Tiere in einer heterozygoten Zucht gehalten wurden, konnten die HBV negativen Geschwistertiere (*littermates*) als Kontrolltiere verwendet werden, diese Tiere werden nachfolgenden als Wildtyp (WT) Tiere bezeichnet.

#### **3.4.1 HBV transgene Mäuse, denen das HBsAg fehlt, zeigen eine konstitutive Interferonantwort**

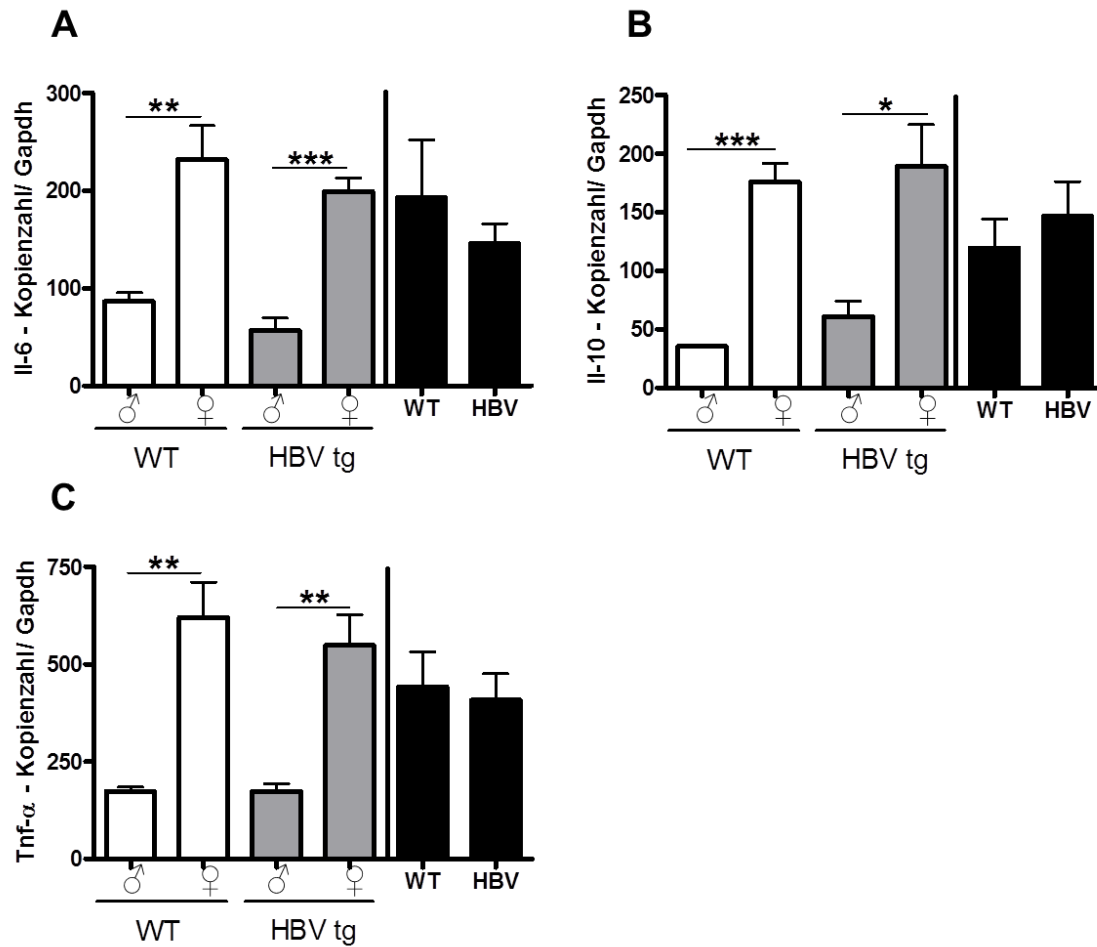
Zunächst erfolgten erste Analysen von unbehandelten HBV-transgenen Mäusen. Die RNA und DNA Untersuchungen mittels qRT-PCR bzw. Southern Blot von totalem Lebergewebe männlicher und weiblicher Tiere zeigten, dass die Menge an HBV-RNA (Abb.3.4.1.A) und DNA (B) in männlichen Tieren signifikant erhöht war.





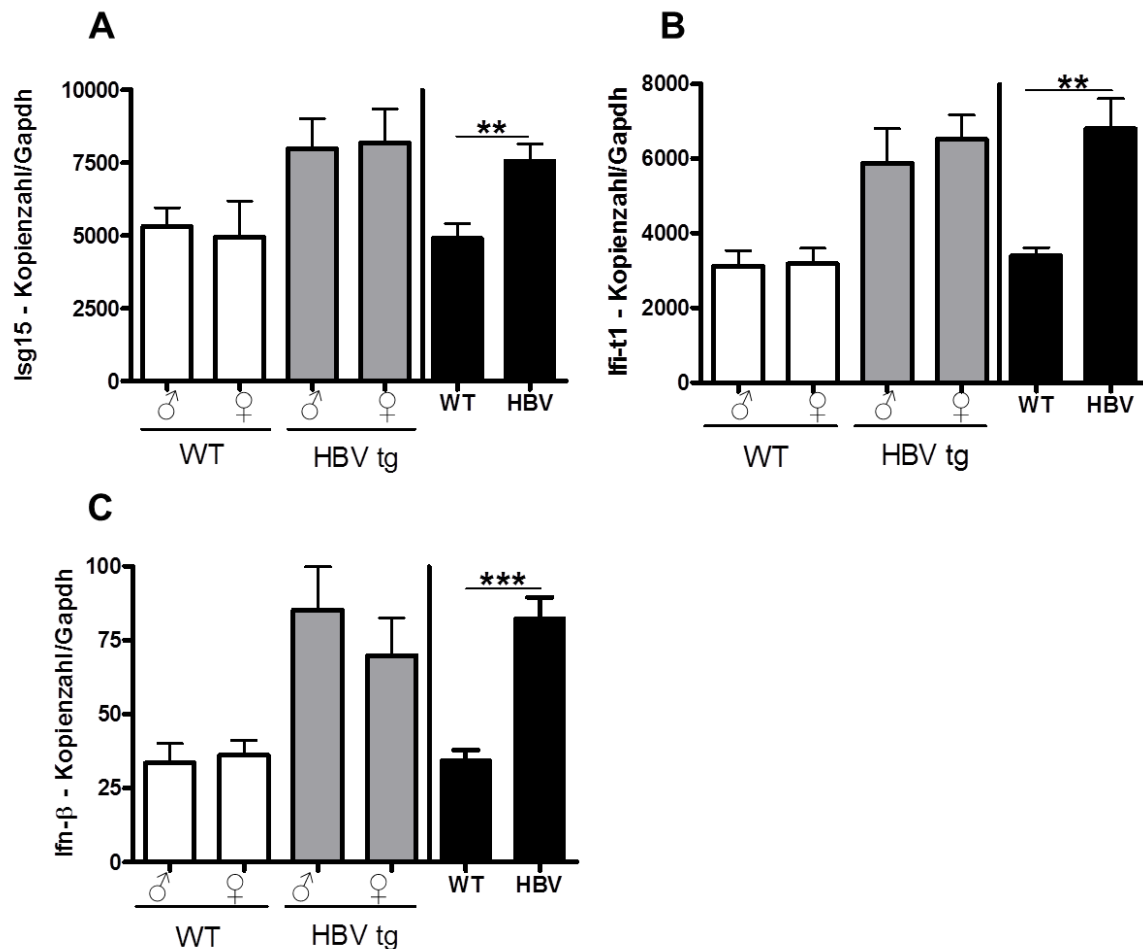
**Abb.3.4.1 Die HBV Expression in männlichen und weiblichen HBVtg Mäusen unterscheidet sich deutlich.** Von 7 Wochen alten HBVtg Mäusen wurde die Leber entnommen, die RNA isoliert und Veränderungen in der Genexpression von HBV wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte $\pm$ SEM) (A). Aus dem Lebergewebe wurde DNA extrahiert und die HBV-DNA mittels Southern Blot dargestellt (B). \*:p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001

Weitere qRT-PCR Analysen verschiedener Zytokine (Il-6, Il-10 und Tnf- $\alpha$ ) ergaben, dass weibliche Mäuse, unabhängig ob Wildtyp (WT) oder HBV transgen (HBVtg), diese Zytokine signifikant verstärkt in der Leber exprimierten (Abb.3.4.2).



**Abb.3.4.2 Männliche und weibliche HBVtg Mäuse weisen unterschiedliche, hepatische Zytokin Expressionsprofile auf.** Von 7 Wochen alten C57BL/6 und HBVtg Mäusen wurde die Leber entnommen, die RNA isoliert und Veränderungen in der Genexpression von Il-6 (A), Il-10 (B) und Tnf-α (C) wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Gegensätzlich dazu verhielten sich die ISGs (Isg15, Ili-t1) und das Iln-β, welche in weiblichen wie männlichen Tieren des jeweiligen Genotyps in gleichen Mengen produziert wurden, jedoch in HBVtg Mäusen im Vergleich zu WT Tieren signifikant erhöht waren (Abb.3.4.3).



**Abb.3.4.3 Die hepatischen ISG Expressionsprofile unterscheiden HBVtg Tiere von den WT Mäusen.** Von 7 Wochen alten C57BL/6 und HBVtg Mäusen wurde die Leber entnommen, die RNA isoliert und Veränderungen in der Genexpression von Isg15 (A), Ifi-t1 (B) und Ifn-β (C) wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Aufgrund der geschlechterspezifischen Unterschiede wurde im weiteren experimentellen Verlauf ausschließlich mit männlichen Tieren gearbeitet, wenn nicht anders beschrieben entsprach ihr Alter 7 Wochen.

Mittels des Proteom Profiler Mouse Cytokine Array Panel A Kits wurde die systemische Immunantwort untersucht, in dem Zytokinlevel im Serum der WT und HBVtg Mäuse bestimmt wurden. Die Tiere unterschieden sich jedoch nicht anhand der Zytokinspiegel im Serum (Daten nicht gezeigt). Zur Determinierung der hepatischen Belastung durch das Virus wurden Leberwerte (GOT/AST, GPT/ALT, LDH, Albumin, Bilirubin und Gesamtprotein) ermittelt und in Tabelle 3.4 dargestellt. Diese unterschieden sich nicht zwischen unbehandelten, WT oder HBVtg Tieren.

Tabelle 3.4 Lebertransaminasen im Serum der HBVtg Mäuse.

	WT (Mittelwert $\pm$ SEM)	HBVtg (Mittelwert $\pm$ SEM)
<b>GOT/AST</b> (IU/L)	105,5 $\pm$ 83,5	123,7 $\pm$ 79,8
<b>GPT/ALT</b> (IU/L)	65,5 $\pm$ 35,5	80,6 $\pm$ 40,1
<b>LDH</b> (IU/L)	2530,5 $\pm$ 1469,5	1489,0 $\pm$ 283,0
<b>Albumin</b> (g/dl)	2,4 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,03
<b>Bilirubin</b> (mg/dl)	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,04
<b>Gesamtprotein</b> (g/dl)	5,0 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,1

### 3.4.2 *In vivo* Anwendung von HBV-spezifischer siRNA

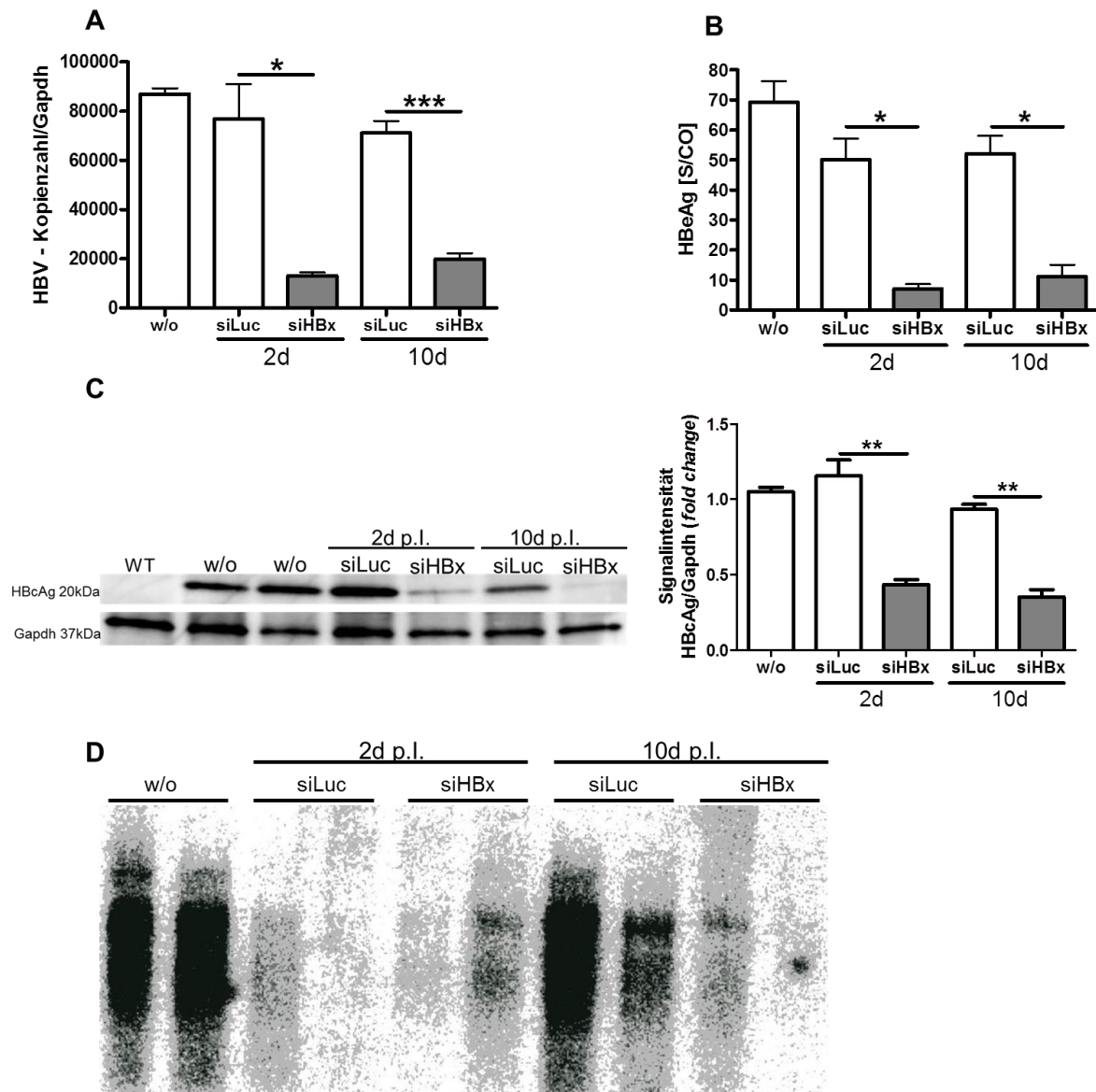
Es wurden 3 verschiedene siRNA Sequenzen gegen das HBxAg mittels Sequenzanalysen generiert, sowie eine Sequenz gegen die HBV DNA-Polymerase (HBV-Pol) (2.1.7.2). Wie beschrieben wurde den HBVtg Mäusen einmalig die LNP01-formulierte siRNA i.v. mit 4 $\mu$ g/g Körpergewicht verabreicht, als Kontrolle diente die siLuc. Nach 2 und 10 Tagen wurde Serum sowie Leber-, Nieren-, Milz- und Herzgewebe entnommen und RNA, DNA, sowie Gesamtprotein isoliert. Teile des Lebergewebes wurden für Paraffinschnitte verwendet und immunhistologisch gefärbt und untersucht. Tabelle 3.5 zeigt die HBV *Knockdown* Effizienz der verschiedene siRNAs in der Leber, ermittelt mittels qRT-PCR. Zwei der drei HBxAg spezifischen Sequenzen (siHBx-8939 und siHBx-9030) verursachten eine signifikante, hepatische Suppression der HBV-RNA zu beiden Zeitpunkten (2 und 10 Tage), die dritte HBxAg-Sequenz (siHBx-8944) sowie die siHBV-Pol hatten keine signifikanten Effekte.

Tabelle 3.5 Hepatische *Knockdown* Effizienzen verschiedener siRNAs in HBVtg Mäusen.

siRNA	2 Tage p.l.		10 Tage p.l.	
	<i>Knockdown</i> Effizienz [%] (Mittelwert $\pm$ SEM)	p-Werte	<i>Knockdown</i> Effizienz [%] (Mittelwert $\pm$ SEM)	p-Werte
siHBx-8939	<b>69,4 <math>\pm</math> 31,88</b>	<b>0,0062</b>	<b>91,8 <math>\pm</math> 27,58</b>	<b>0,0031</b>
siHBx-9030	<b>81,0 <math>\pm</math> 10,49</b>	<b>0,0465</b>	<b>75,6 <math>\pm</math> 12,46</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
siHBx-8944	42,3 $\pm$ 32,73	0,2428	45,7 $\pm$ 20,95	0,1061
siHBV-Pol	19,2 $\pm$ 17,47	0,5663	63,1 $\pm$ 43,49	0,0536

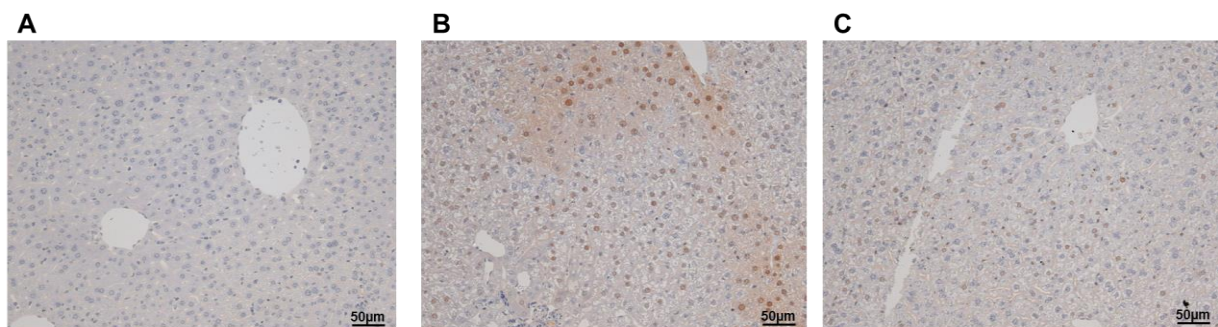
Alle folgenden Ergebnisse wurden mit der siHBx-9030 generiert (Abb.3.4.4.). Aufgrund dessen, dass die Mäuse ein HBV *Knock-in* Stamm sind, in welchem das HBV-Genom theoretisch in allen Körperzellen integriert sein kann und vermutlich

auch abgelesen wird, konnte mittels qRT-PCR in allen untersuchten Geweben (Herz, Milz, Niere) HBV-RNA detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Wie zu erwarten war jedoch der LNP01-siRNA-vermittelte *Knockdown* nur in der Leber signifikant detektierbar (Abb.3.4.4.A).



**Abb.3.4.4 Die Behandlung mit HBx-spezifischer siRNA führt zur HBV-Suppression *in vivo*.** 7 Wochen alte, männliche HBVtg Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Ihre HBV negativen Geschwister dienten als Kontrolle. 2 bzw. 10 Tage nach der Injektion wurden die Lebern und Blut entnommen. Die RNA wurde aus dem Lebergewebe isoliert und Veränderungen in der Genexpression von HBV mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM) (A). Aus dem Blut wurde Serum gewonnen und HBeAg Level mittels ELISA gemessen (Mittelwerte±SEM) (B). Gesamtprotein wurde isoliert und 30µg per Western Blot analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels densitometrischer Analyse von HBcAg/Gapdh (C). Aus dem Lebergewebe wurde DNA extrahiert und die Veränderungen in der HBV-DNA-Replikation mittels Southern Blot dargestellt (D). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001; d p.i.: days post Injection (Tage nach der Injektion)

Die Ergebnisse konnten auch mittels HBeAg-ELISA im Serum validiert werden (Abb.3.4.4.B), 2 Tage nach Applikation lag eine Suppression der HBeAg Konzentration von  $87,2\% \pm 21,3$  (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p=0,0178$ ), nach 10 Tagen von  $80,0\% \pm 35,5$  (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p=0,0164$ ) vor. Auch die Proteinanalyse von totalem Lebergewebe mittels Western Blot (C) wies eine hepatische HBcAg Reduktion in HBVtg Tieren auf. Diese betrug nach 2 Tagen  $61,8\% \pm 1,94$  (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p=0,0037$ ) bzw.  $66,99\% \pm 4,24$  (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p=0,002$ ) am 10. Tag nach Applikation der HBx-spezifischen siRNA. Der Southern Blot zeigt die HBV-DNA aus gesamt Lebergewebe und auch hier konnte eine siRNA-vermittelte HBV-Reduktion nach 2 und 10 Tagen beobachtet werden (D). Auch die mikroskopische Untersuchung der Lebern von WT (3.4.5.A), HBV-tg (B) und HBV-tg Tieren nach siRNA Applikation (C) nach immunhistochemischer Färbung mit einem HBcAg spezifischen Antikörper zeigte eine deutliche HBcAg Reduktion 10 Tage nach siHBx Behandlung.

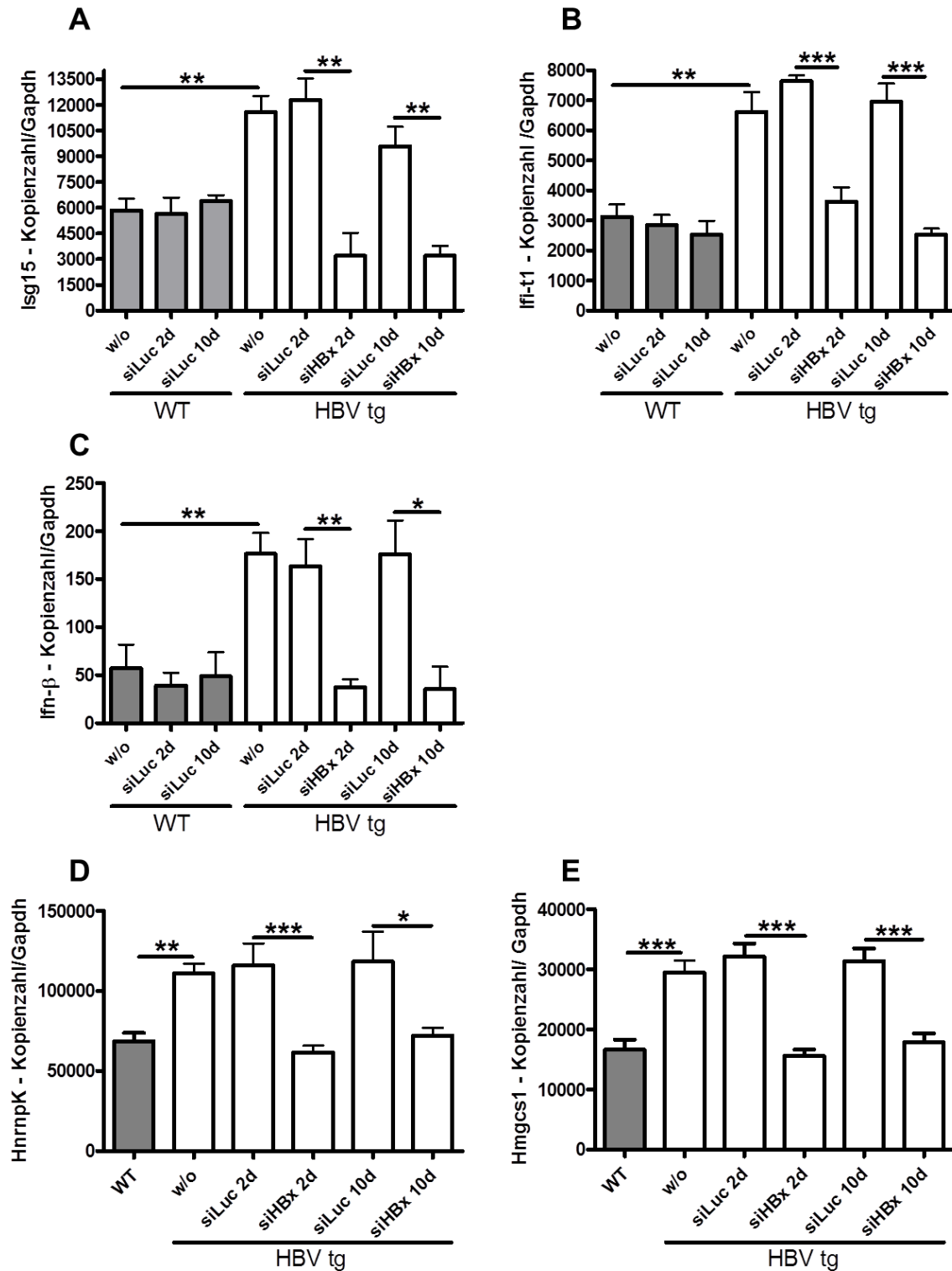


**Abb.3.4.5 Immunhistochemische Analyse des HBcAg.** 7 Wochen alte, männliche HBVtg Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Ihre C57BL/6 Mäuse dienten als Kontrolle. 10 Tage nach der Injektion wurden die Lebern entnommen, das Lebergewebe fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Es wurde eine HBcAg/Hämatoxylin Färbung durchgeführt. In 20x Vergrößerung abgebildet: C57BL/6 (A), HBVtg (B) and HBVtg + siHBx (C).

Die Gesamtheit dieser Analysen zeigte, dass durch den Einsatz von HBx-spezifischer siRNA eine erfolgreiche Suppression des HBV auf DNA-, RNA- und Proteinebene (HBeAg, HBcAg) erreicht wird.

### **3.4.3 Die HBV-Therapie mit spezifischen siRNAs normalisiert die Interferonantwort**

Um zu untersuchen, ob die erhöhten hepatischen ISGs und Ifn- $\beta$  Expressionslevel in HBVtg Tieren durch die HBV-Replikation induziert worden sind, wurden diese auch nach siRNA-Behandlung mittels qRT-PCR analysiert. Die Abb.3.4.6.A-C zeigt, dass nach siRNA-Behandlung die hepatische Interferonantwort wieder ein Wildtyp-Niveau erreicht und dieser Zustand über einen Zeitraum von 2 bis 10 Tagen nach einmaliger Applikation anhielt.



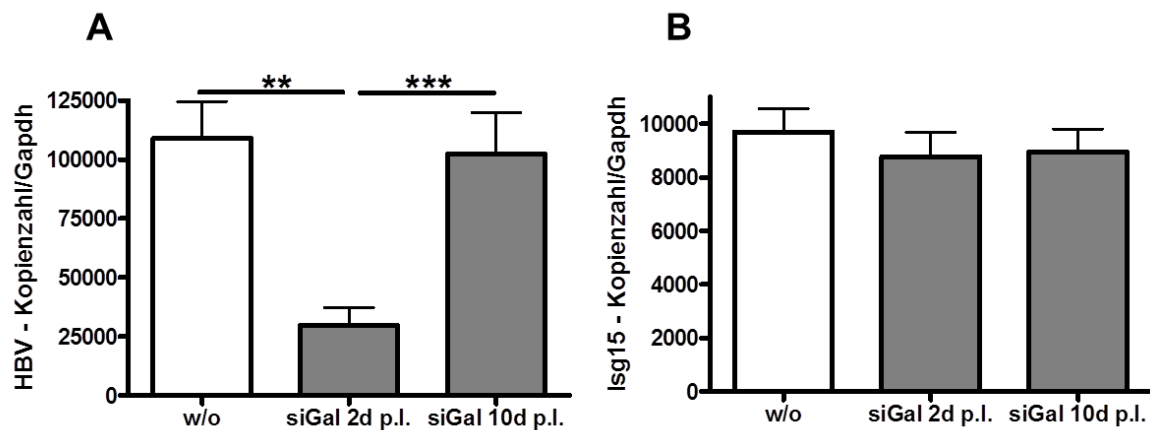
**Abb.3.4.6 Die Behandlung mit HBx-spezifischer siRNA führt in den Lebern der HBVtg Mäuse zu einer Reduktion der IFN/ISG Expression.** 7 Wochen alte, männliche HBVtg Mäuse erhielten 200µl der LNP01-formulierten siRNA (4µg/g) durch eine Injektion in die Schwanzvene. Ihre HBV negativen Geschwister dienten als Kontrolle. 2 bzw. 10 Tage nach der Injektion wurden die Lebern entnommen, die RNA isoliert und Veränderungen in der Genexpression von Isg15 (A), Ifi-t1 (B), Ifn-β (C), Hnrnp K (D) und Hmgcs1 (E) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001 d: days (Tage nach der Injektion)



Im Ergebnisteil 3.3 dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter anderem Hnrnp K und Hmgcs1 mit der Isg15 Expression zusammenhängen. Die qRT-PCR Analysen zeigten, dass auch in den HBVtg Mäusen beide Faktoren, Hnrnp K sowie Hmgcs1, signifikant erhöht waren. Hnrnp K war im Durchschnitt um den Faktor  $1,6 \pm 0,8$  ( $p=0,0036$ ) (D) und Hmgcs1 um den Faktor  $8,1 \pm 0,7$  ( $p=0,0005$ ) (E) erhöht. Die Behandlung der HBVtg Mäuse mit der spezifischen HBxAg siRNA führte auch hier zwei und zehn Tage nach der Applikation zur signifikanten Reduktion der mRNA Level auf WT Niveau (D und E).

#### **3.4.4 *In vivo* Anwendung von unspezifischen siRNAs führt zur HBV-Suppression**

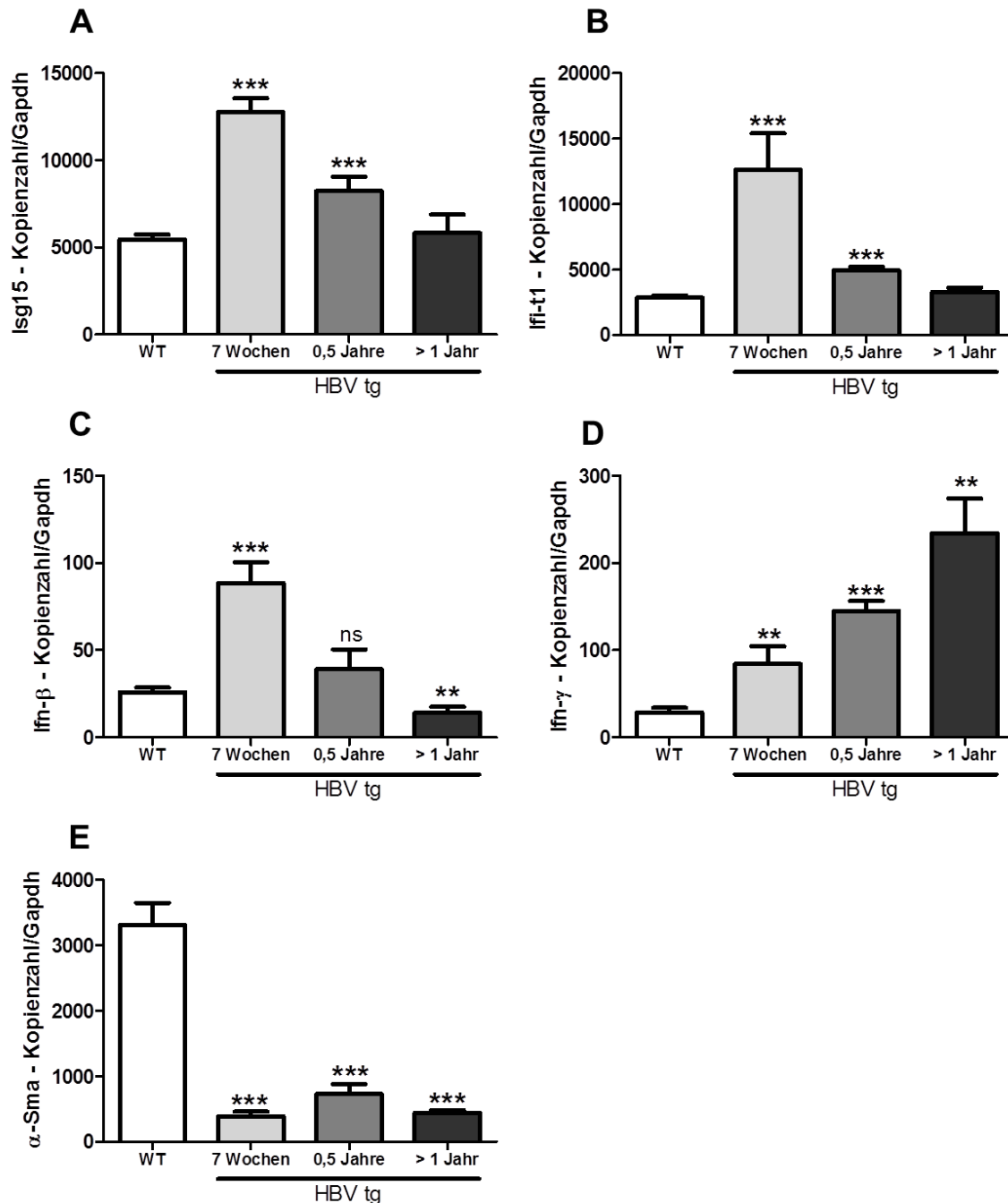
Im Gegensatz zu allen anderen Analysen (qRT-PCR und Western Blot) zeigte der Southern Blot (Abb.3.4.4.D) eine Verringerung der HBV-DNA auch 2 Tage nach Applikation der Kontroll-siRNA (siLuc). Um zu untersuchen, ob dies ein genereller siRNA-induzierter *off-target* Effekt war, wurde den HBVtg Mäusen die siGal mit  $4\mu\text{g/g}$  Körpergewicht i.v. injiziert. Hierzu wurde 2 bzw. 10 Tage nach Applikation mittels qRT-PCR das Niveau der HBV- bzw. Isg15-mRNA Expression im Gesamtlebergewebe analysiert. Die Abb.3.4.7.A zeigt, dass 2 Tage nach siGal Applikation die HBV-RNA um  $72,8 \pm 0,1\%$  (Mittelwert $\pm$ SEM;  $p=0,0007$ ) reduziert war, nach 10 Tagen jedoch wieder ihr Ausgangslevel erreicht hatte. Die Isg15 Expression, als genereller Marker für eine Interferonantwort, wurde innerhalb des Zeitraumes nicht beeinträchtigt (B). Dies zeigt, dass durch die siRNA Applikation „kurzzeitig“ eine unspezifische HBV-Suppression bewirkt werden kann, welche nach 10 Tagen jedoch nicht mehr evident war.



**Abb.3.4.7 Eine nicht-kodierende siRNA supprimiert kurzzeitig die HBV-Replikation *in vivo*.** 7 Wochen alte, männliche HBVtg Mäusen erhielten die siRNA siGal in einer Dosierung von 4µg/g Körpergewicht. 2 bzw. 10 Tage nach der Injektion wurde die Leber entnommen, die RNA isoliert und Veränderungen in der Genexpression von HBV (A) und Isg15 (B) mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001 d: days (Tage nach der Injektion)

### 3.4.5 Die HBV-induzierte Interferonantwort verändert sich im Lebenszyklus

Um die anhaltende Typ I Interferonantwort in den HBVtg Mäusen näher zu untersuchen, wurde die komplette Leber von unbehandelten Tieren verschiedener Altersgruppen (7 Wochen, 6 Monate und älter als ein Jahr) mittels qRT-PCR analysiert. Wie beschrieben wurde die Genexpression von HBV, Isg15, Ifi-t1, Ifn- $\beta$ , und zusätzlich von Ifn- $\gamma$  (Gruppe der Typ II Interferone) und  $\alpha$ -Sma untersucht. Die WT Tiere waren eine Gruppe aus den jeweiligen HBV negativen Geschwistertieren (7 Wochen, 0,5 Jahre alt und älter als 1 Jahr).



**Abb.3.4.8 Die HBV-induzierte Interferonantwort verändert sich im Lebenszyklus.**

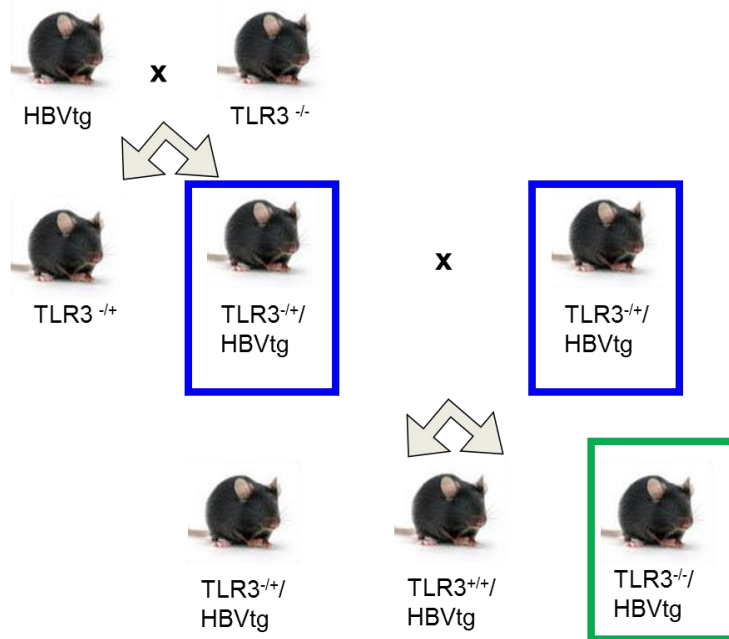
Männlichen HBVtg Mäusen und ihren HBV negativen Geschwistertieren (WT), wurde im Alter von 7 Wochen, 0,5 Jahren oder älter als ein Jahr, die Leber entnommen. Die RNA wurde isoliert und Veränderungen in der Genexpression von Isg15 (A), Ifi-t1 (B), Ifn-β (C), Ifn-γ (D) und α-Sma (E) wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Es zeigte sich, dass die Typ I Interferonantwort und die damit assoziierten ISGs eine „frühe“ Immunantwort auf das Hepatitis-B-Virus waren. Ifn-β (Abb.3.4.8.C) war bei 7 Wochen alten Tieren um das  $3,4 \pm 0,7$  ( $p < 0,0001$ ) fache erhöht, die 0,5 Jahre alten

Tiere zeigten das gleiche Expressionsniveau wie WT Tiere ( $p=0,0939$ ), bei Tieren, älter als 1 Jahr ( $> 1$  Jahr) konnte sogar eine  $0,5\pm0,2$  ( $p=0,0078$ )-fach geringere Ifn- $\beta$  Expression als in WT Tieren detektiert werden. Die Immunantwort der ISGs, Isg15 (A) und Ifi-t1 (B), war sowohl in 7 Wochen alten Tieren um das  $2,4\pm0,2$  (Isg15) bzw.  $4,4\pm0,8$  (Ifi-t1), als auch in 0,5 Jahre alten Tieren noch um 50% signifikant ( $p<0,0001$ ) erhöht, jedoch in Tieren, welche älter als 1 Jahr waren, hatte sie wieder WT Niveau angenommen. Gegensätzlich dazu verlief die Typ II Interferonantwort, repräsentiert durch Ifn- $\gamma$  (D), sie war in allen untersuchten Lebensabschnitten der HBVtg Mäuse signifikant erhöht und steigerte sich im Lebensverlauf von der  $3,0\pm0,5$  ( $p=0,0098$ ) fachen Induktion bei 7 Wochen alten Tieren, auf eine  $8,3\pm1,8$  ( $p=0,0014$ ) fache Induktion, bei Tieren älter als ein Jahr, verglichen mit Wildtyp Tieren. Die  $\alpha$ -Sma Expression, als Marker für aktivierte Sternzellen und die Fibrogenese, war generell in den HBVtg Mäusen signifikant ( $p<0,0001$ ) reduziert, verglichen mit den WT Tieren, unabhängig von dem Alter der Mäuse (E).

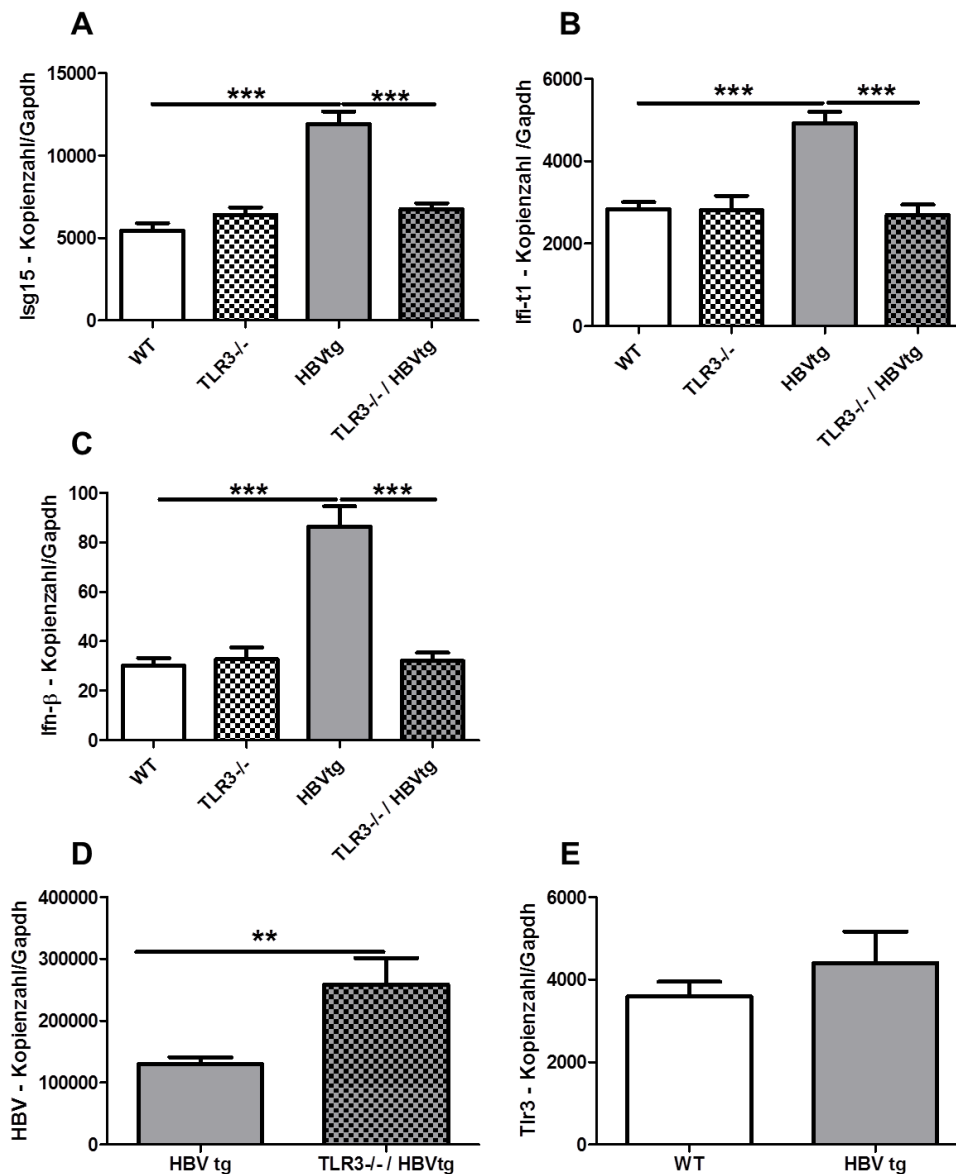
#### **3.4.6 Die HBV induzierte Interferonantwort in HBsAg defizienten Tieren ist TLR3 abhängig**

Durch die Verpaarung von HBVtg Mäusen mit TLR3<sup>-/-</sup> *Knockout* Tieren (Alexopoulou *et al.* 2001) wurde eine neue Mauslinie generiert (Zuchtschema Abb.3.4.9), im Nachfolgenden als TLR3<sup>-/-</sup>/HBVtg bezeichnet. Anhand dieser sollte untersucht werden, ob die hepatische Typ I Interferon Induktion und die daraus resultierende erhöhte ISG Expression, TLR3 abhängig waren.



**Abb.3.4.9 Zuchtschema zur Generierung von  $TLR3^{-/-}/HBVtg$  Mäusen.**  $HBVtg$  Mäuse wurden mit  $TLR3^{-/-}$  *Knockout* Tieren verpaart. Die  $TLR3^{-/+}/HBVtg$  Tiere der F1-Generation wurden untereinander erneut verpaart. In der F2-Generation wurden neben  $TLR3^{+/+}/HBVtg$  und  $TLR3^{-/+}/HBVtg$  auch die gewünschten  $TLR3^{-/-}/HBVtg$  Mäuse erhalten.

Es wurde mittels qRT-PCR die Gesamt-RNA der Leber von unbehandelten 7 Wochen alten männlichen WT,  $TLR3^{-/-}$ ,  $HBVtg$  und  $TLR3^{-/-}/HBVtg$  Tieren analysiert und miteinander verglichen.



**Abb.3.4.10 Der Toll-like Rezeptor 3 ist in HBVtg Mäusen konstitutiv aktiviert und supprimiert die HBV-Replikation.** HBVtg Mäuse wurden mit TLR3<sup>-/-</sup> Knockout Mäusen gekreuzt. 7 Wochen alten, männlichen Mäusen (WT (HBV negativ), TLR3<sup>-/-</sup> Knockout, HBVtg und HBV/TLR3<sup>-/-</sup>) wurde die Leber entnommen, die RNA isoliert und Veränderungen in der Genexpression von Isg15 (A), Ifi-t1 (B), Ifn-β (C), HBV (D) und Tlr3 (E) wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Die Expressionslevel von Isg15 (Abb.3.4.10.A), Ifi-t1(B) und Ifn-β (C) in den TLR3<sup>-/-</sup>/HBVtg Mäusen glichen denen der WT Tiere. Es wurden keine erhöhten IFN oder ISG Level gefunden, wie es in HBVtg Tieren mit funktionalem TLR3 Signalweg der Fall war. Zudem ergaben die Analysen, dass in den TLR3<sup>-/-</sup>/HBVtg Tieren die Menge an HBV-RNA signifikant erhöht war (p=0,0074), verglichen mit HBVtg Tieren (D). Die Level an TLR3 mRNA unterschied sich jedoch nicht in den HBVtg Tieren von denen der WT Tiere (E).

### 3.4.7 Toll-like Rezeptor Liganden unterbinden die HBV-Replikation *in vivo*

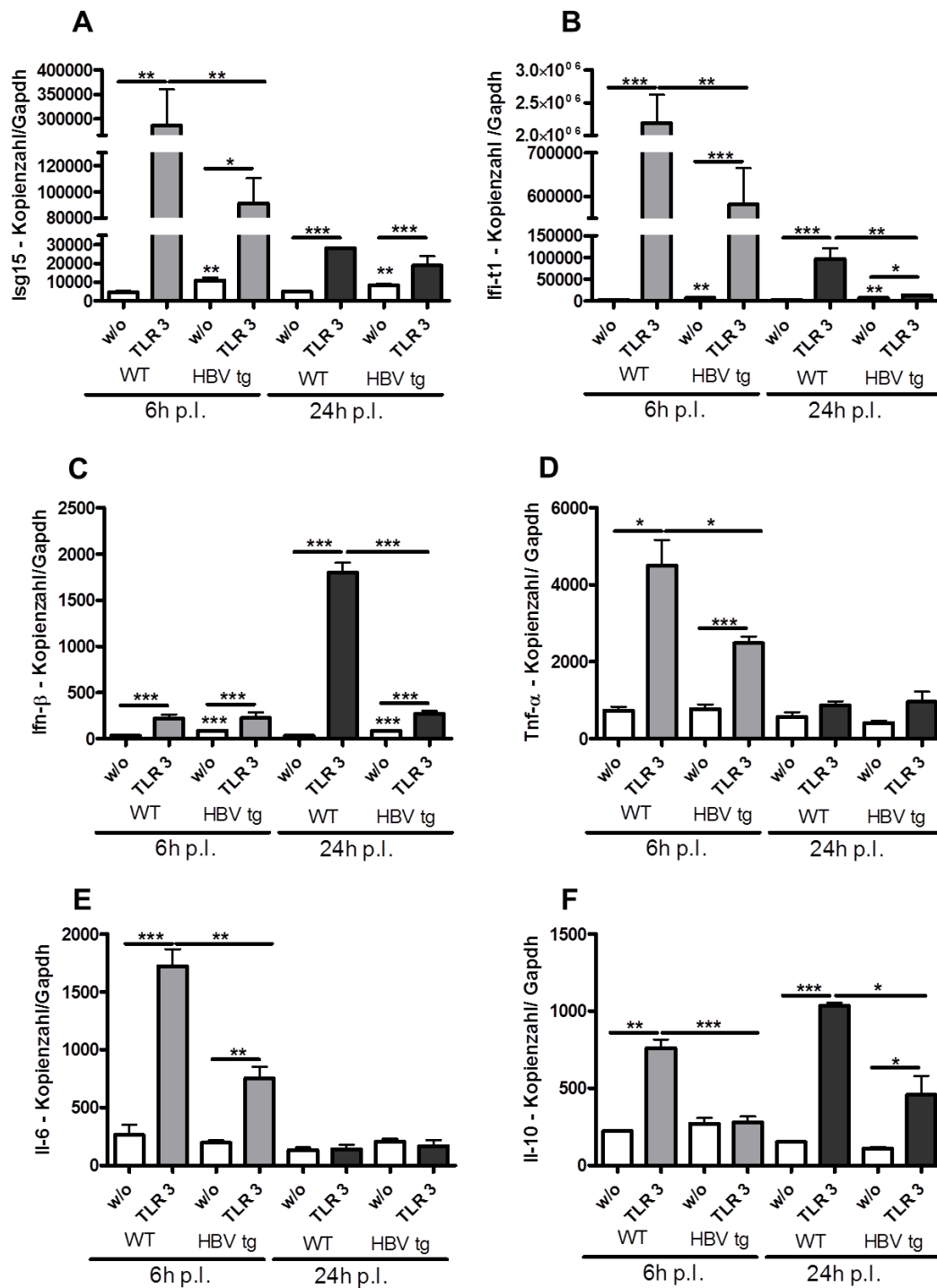
Zuvor (3.4.3) wurde gezeigt, dass unspezifische, TLR-aktivierende siRNAs (siGal) einen „kurzfristigen“, supprimierenden Effekt auf die HBV-Replikation hatten. Zur Analyse der Auswirkungen von TLR-Liganden auf die HBV-Replikation in dem vorliegenden Modell wurde HBVtg Tieren sowie den WT *littermates* einmalig, 4µg/g Körpergewicht TLR3-, TLR7- oder TLR9-Ligand i.v. verabreicht. Nach 6h oder 24h wurde Lebergewebe entnommen, RNA isoliert und Genexpression mittels qRT-PCR analysiert. Die Ergebnisse (Tabelle 3.6) zeigen, dass alle drei verwendeten TLR-Liganden einen signifikant suppressiven Effekt auf die virale Replikation nach 24h hatten, der TLR3 Ligand PolyI:C sogar auch 6h nach Verabreichung.

**Tabelle 3.6 Hepatische HBV-Suppression in HBVtg Mäusen, nach TLR-Liganden Injektion.**

Ligand	6h nach Applikation Suppression [%]		24h nach Applikation Suppression [%]	
	(Mittelwert ±SEM)	p-Wert	(Mittelwert ±SEM)	p-Wert
TLR3	62,1 ±2,5	0,0378	71,7 ±3,0	0,0458
TLR7	59,8 ±5,6	0,0727	73,3 ±4,9	0,0024
TLR9	17,7 ±1,1	0,5452	57,8 ±3,8	0,0019

### 3.4.8 HBV supprimiert die TLR-vermittelte hepatische Immunantwort *in vivo*

Die *in vitro* Untersuchungen von Wu *et al.* (Wu *et al.* 2009) haben gezeigt, dass das HBV die TLR-vermittelte Immunantwort in murinen Leberzellen supprimieren kann. Hierbei spielt das HBs Antigen eine entscheidende Rolle (Jiang *et al.* 2013). Die vorliegenden *in vivo* Daten aus den Tg1,4HBV-s-mut(3) Tieren zeigten jedoch eine anhaltende, TLR3-vermittelte Immunantwort, sowie zusätzlich aktivierbare TLR3-, TLR7- und TLR9-Antworten. Die immunsuppressiven Eigenschaften des HBV auf TLR-vermittelte Immunantworten in diesem Mausmodell, ohne *small* HBsAg, wurden anhand HBVtg Mäuse sowie den WT *littermates* untersucht (Versuchsablauf wie unter 3.4.7).

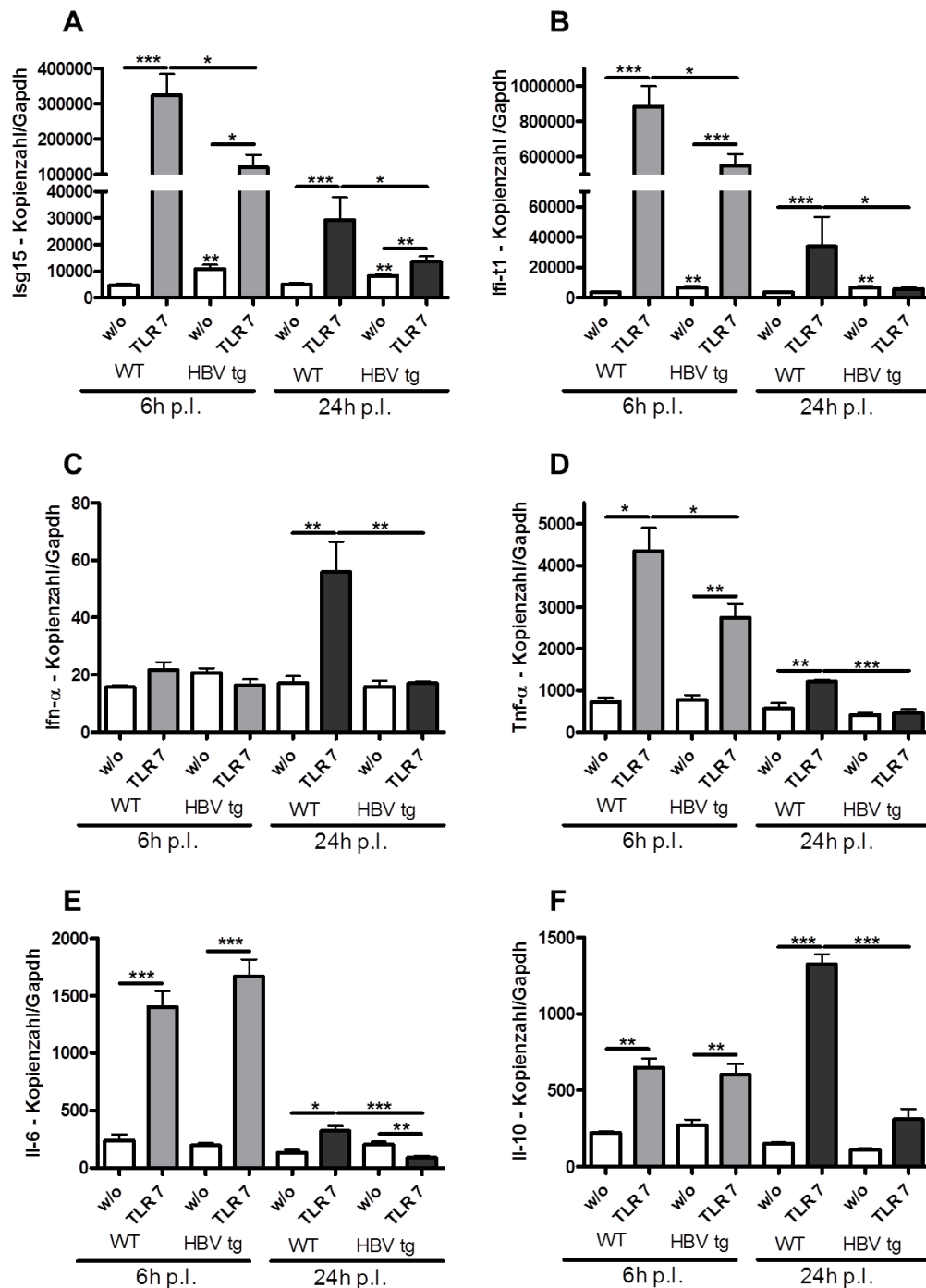


**Abb.3.4.11 Die Toll-like Rezeptor 3 induzierte Immunantwort unterscheidet sich nach 6h signifikant in HBVtg und WT Mäusen.** 7 Wochen alte, männliche HBVtg Mäuse und ihre HBV negativen Geschwistertiere (WT) erhielten 4µg/g Körpergewicht des TLR3 Liganden (PolyI:C). 6h bzw. 24h nach der Injektion wurde die Leber entnommen, die RNA isoliert und Veränderungen in der Genexpression von Isg15 (A), Ifi-t1 (B), Ifn-β (C), Tnf-α (D), Il-6 (E) und Il-10 (F) wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001



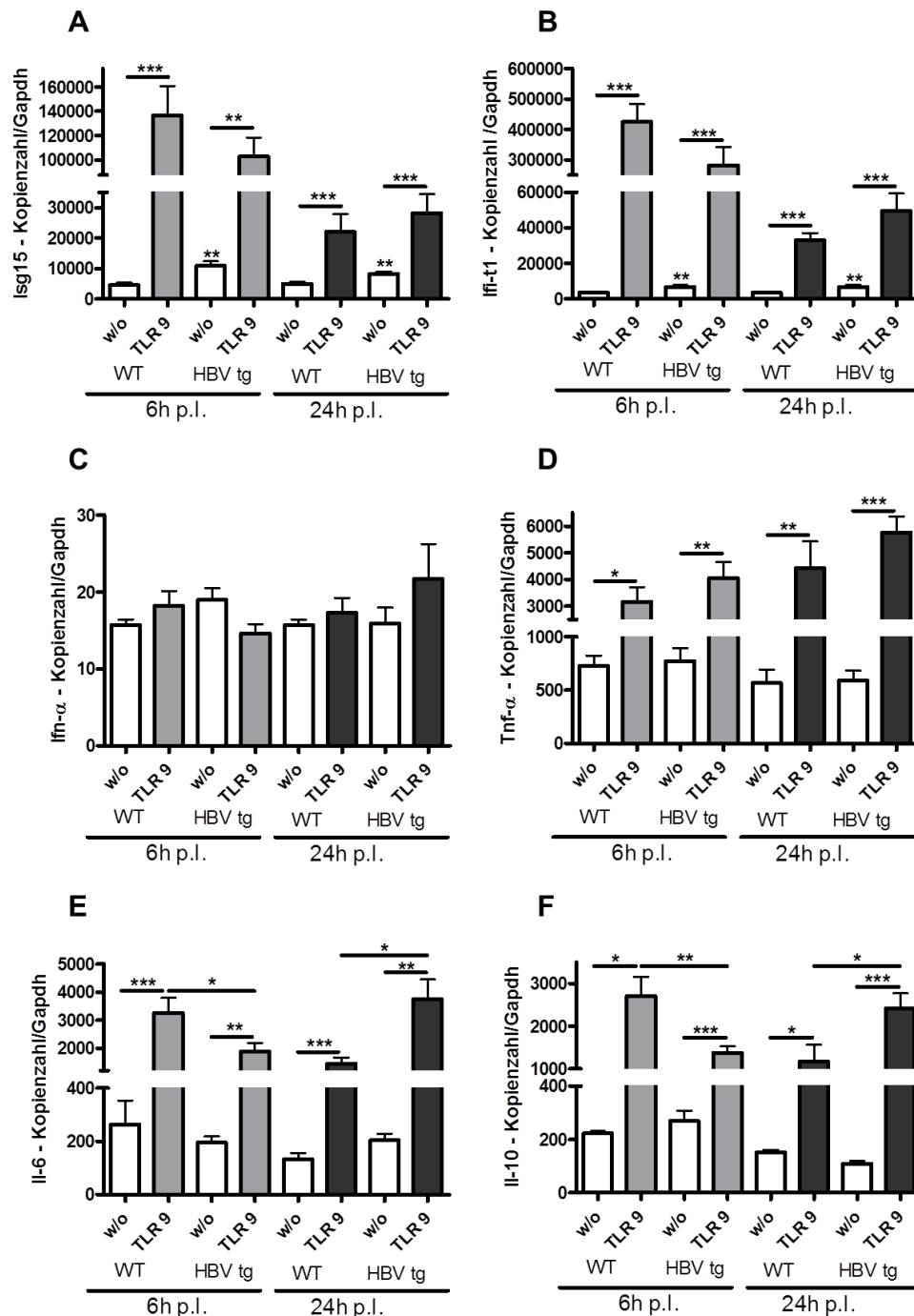
Die Analysen 6h nach PolyI:C Applikation ergaben, dass in den HBV transgenen Tieren die Immunantwort in Form von Isg15, Il-6, Il-10 und Tnf- $\alpha$  signifikant schwächer war als in den Wildtyp Tieren. Verglichen mit den unbehandelten HBVtg Kontrolltieren war jedoch trotzdem eine signifikante Induktion dieser Gene messbar. Nach 24h war dieser Effekt in der Il-10 Expression noch immer detektierbar. Besonders verhielt sich Ifn- $\beta$ , da 6h nach der PolyI:C Applikation eine signifikante Induktion von Ifn- $\beta$  jedoch kein Unterschied zwischen HBVtg und WT Tieren detektierbar war. Nach 24h zeigten die WT Tiere aber eine deutliche Ifn- $\beta$  Induktion nach PolyI:C, welche verglichen mit den HBVtg Tieren signifikant verstärkt war.

Eine ähnliche Reaktion, jedoch um 24h verzögert, zeigten auch die qRT-PCR Analysen der HBVtg Tiere nach Gardiquimod (TLR7-Ligand) Applikation. Auch hier war die Immunantwort von Tnf- $\alpha$ , Isg15, Ifn- $\alpha$ , Il-6 und Il-10 in den HBV negativen Geschwistertieren signifikant stärker. Für die Expression von Isg15 und Tnf- $\alpha$  traf dies ebenfalls auf den früheren 6h Zeitpunkt zu. Die TLR7 induzierte Ifn- $\alpha$  Expression war in den HBVtg Mäusen komplett supprimiert im Gegensatz zu den WT Tieren.



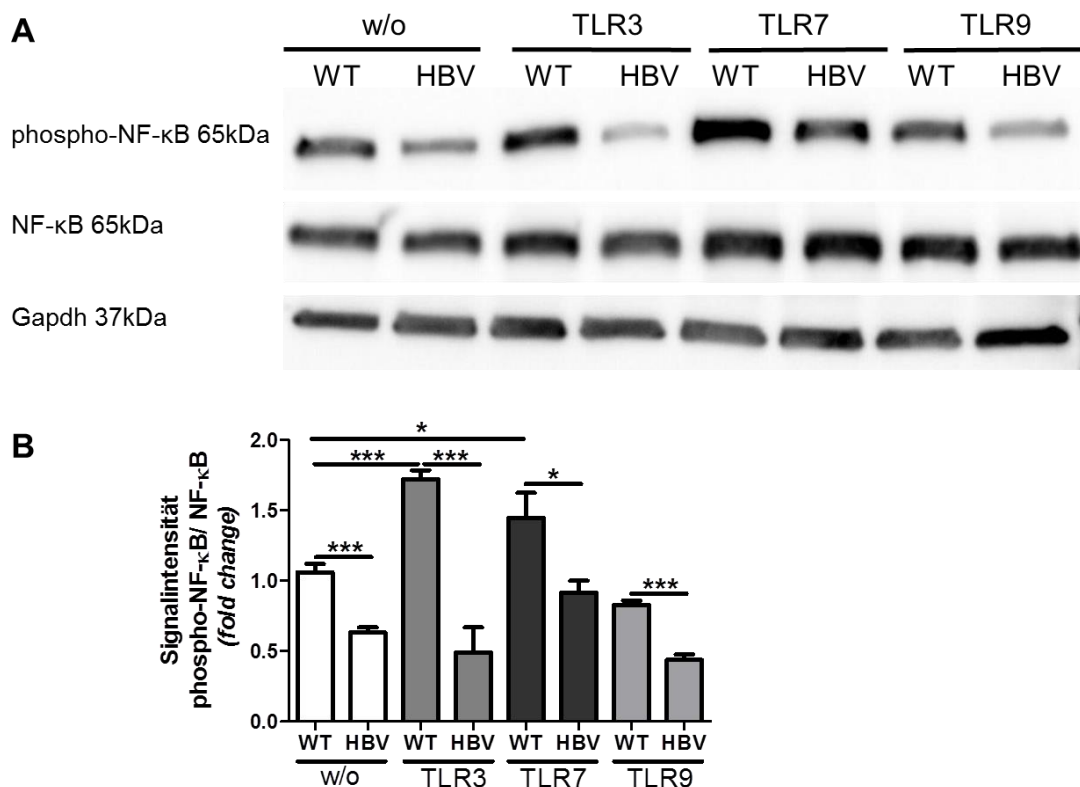
**Abb.3.4.12 Die Toll-like Rezeptor 7 induzierte Immunantwort unterscheidet sich nach 24h signifikant in HBVtg und WT Mäusen.** 7 Wochen alte, männliche HBVtg Mäuse und ihre HBV negativen Geschwistertiere (WT) erhielten 4µg/g Körpergewicht des TLR7 Liganden (Gardiquimod). 6h bzw. 24h nach der Injektion wurde die Leber entnommen, die RNA isoliert und Veränderungen in der Genexpression von Isg15 (A), Ifi-t1 (B), Ifn-α (C), Tnf-α (D), Il-6 (E) und Il-10 (F) wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Die gleichen Analysen erfolgten auch nach Applikation des TLR9-Liganden, ODN1826. Es konnte in den HBVtg Tieren eine zeitlich verzögerte, aber keine abgeschwächte oder inhibierte Immunantwort detektiert werden.



**Abb.3.4.13 Die Toll-like Rezeptor 9 induzierte Immunantwort unterscheidet sich nur im zeitlichen Verlauf in HBVtg und WT Mäusen.** 7 Wochen alte, männliche HBVtg Mäuse und ihre HBV negativen Geschwistertiere (WT) erhielten 4µg/g Körpergewicht des TLR9 Liganden (ODN1826). 6h bzw. 24h nach der Injektion wurde die Leber entnommen, die RNA isoliert und Veränderungen in der Genexpression von Isg15 (A), Ifi-t1 (B), Ifn-α (C), Tnf-α (D), Il-6 (E) und Il-10 (F) wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Die Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien Gapdh normalisiert (Mittelwerte±SEM). \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p<0,001

Western Blot Analysen (Abb.3.4.14) von 30µg Gesamtprotein aus der Leber von WT und HBVtg Tieren 6h nach Applikation der TLR-Liganden (TLR3/TLR7/TLR9), zeigten eine signifikant ( $p=0,0007$ ;  $p=0,0006$ ;  $p=0,0002$ ) verminderte Phosphorylierung von NF-κB in HBVtg Mäusen, unabhängig davon, ob die Tiere mit einem Liganden stimuliert worden waren. In WT Tieren induzierten nur die Liganden von TLR3 ( $p=0,0001$ ) und TLR7 ( $p=0,0431$ ) eine signifikante NF-κB Phosphorylierung.



**Abb.3.4.14 Die NF-κB Phosphorylierung ist in HBVtg Mäusen signifikant reduziert.** 7 Wochen alte, männliche HBVtg Mäuse und ihre HBV negative Geschwistertiere (WT) erhielten 4µg/g Körpergewicht der TLR-Liganden (PolyI:C, Gardiquimod und ODN1826). 6h nach der Injektion wurde die Leber entnommen, Gesamtprotein isoliert und 30µg mittels Western Blot analysiert (A). Die Auswertung erfolgte mittels densitometrischer Analyse von phospho-NF-κB/ NF-κB (B). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

## 4 Diskussion

### 4.1 Chemische Modifizierungen an siRNAs verhindern eine TLR-abhängige Aktivierung des hepatischen Immunsystems

*Small interfering RNA* sind kurze Ribonukleinsäure-Moleküle, die keine Proteine kodieren, sondern im Rahmen der RNA-Interferenz eine wichtige Rolle bei der Verteidigung gegen Viren und bei der Regulation der Genexpression übernehmen. Die RNA-Interferenz hat sich als vielversprechender Ansatz zur Behandlung verschiedener Erkrankungen herausgestellt. Sie ermöglicht das gezielte Eingreifen in die Genregulation einer Zelle, wodurch z.B. krankheitsverantwortliche Gene inhibiert werden können. Die Grundvoraussetzung zur siRNA-Therapie von Lebererkrankungen wie der viralen Hepatitis oder dem hepatozellulärem Karzinom (HCC) ist die systemische Applikation der siRNA, welche gezielt von den betroffenen Zellen aufgenommen werden muss. Zusätzlich müssen mögliche Nebenwirkungen (*off-target* Effekte) vermieden werden. Da das angeborene Immunsystem unter anderem fremde RNAs erkennt (Akira *et al.* 2006), ist eine inflammatorische Immunantwort die Folge der siRNA Behandlung, gezeigt durch verschiedene Studien (Judge & MacLachlan 2008). Jedoch ist bisher nicht beschrieben worden, ob, wie und welche der verschiedenen Leberzellpopulationen beteiligt sind. Es ist bekannt, dass sowohl Hepatozyten als auch NPC auf die Stimulation aller TLR-Liganden reagieren und somit potenziell eine Reaktion auf die siRNAs zeigen könnten (Broering, Lu & Schlaak 2011).

Die ersten *in vitro* Experimente mit primär isolierten Leberzellpopulationen zeigten, dass alle drei untersuchten Zelltypen (PMH, KC, LSEC) auf die unmodifizierte siGal mit einer signifikanten Immunantwort reagierten, auch siApoB und siApoB-Chol induzierten eine schwächere Immunantwort. Die O'Methyl-modifizierte siLuc induzierte hingegen keine Expression von Ifn- $\beta$  oder Tnf- $\alpha$ . Generell war die Immunantwort der LSEC und KC stärker als die der Hepatozyten. Der Aufbau der Leber führt dazu, dass LSEC und KC als erste mit den im Blut vorhandenen Pathogenen konfrontiert sind und die erste Abwehrlinie bilden müssen. Die KC sind Bestandteil der zellulären Immunabwehr, ihre physiologische Aufgabe als Makrophagen der Leber ist die Aufnahme, Verarbeitung und die Präsentation von antigenem Material (*blood clearance*). Mit ihrer Fähigkeit zur Zytokinproduktion und Sekretion (Il-6, Tnf- $\alpha$ , Tgf- $\beta$ , Ifn- $\alpha$  und Ifn- $\beta$ ) können die KC eine systemische

Immunantwort modulieren (Bradfield 1974). Neben ihrer Barrierefunktion zwischen dem Blutstrom und den Hepatozyten fungieren auch die LSEC als Zellen, die lösliches Material aus dem Blutstrom aufnehmen, dieses wird entweder lysosomal abgebaut oder selektiv zu den Hepatozyten transportiert. Genauso wie KC sekretieren auch die LSEC Zytokine (Knolle & Gerken 2000). Diese natürlichen Funktionen der KC und LSEC begründen, dass auch bei der *in vitro* Behandlung mit siRNA hier die Immunantwort stärker ausfällt als die der Hepatozyten.

Die Ergebnisse zeigen, dass kodierende Sequenzen wie die siApoB auch ohne Ribose-Modifikation einen geringeren stimulativen Effekt auf das hepatische Immunsystem haben. Nicht-kodierende Sequenzen wie die siLuc (Luciferase) können mittels Ribose-Modifikation (2'O-Methyl) diese inflammatorische Immunantwort umgehen. Bestimmte Sequenzmotive wie „UGUGU“ oder „GUCCUUCAA“ können das immunstimulatorische Potenzial von siRNAs steigern (Judge *et al.* 2005; Hornung *et al.* 2005), wie es bei der siGal der Fall ist. Auch die Länge der siRNA siGal mit 25 Basenpaaren trägt zu der erhöhten Immunreaktivität bei.

Der immunstimulative Effekt, den die siGal in allen getesteten Zelltypen auslöste und der von siApoB und siApoB-Chol in Endothelzellen induziert wurde, konnte durch die Zugabe von Chloroquin inhibiert werden. Chloroquin verhindert die Ansäuerung des Endosoms, was zur Suppression der endosomalen TLRs (TLR3, -7, -8, -9 und -13) führt (He *et al.* 2013). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die endosomalen TLRs in der Leber für die Detektion der siRNAs verantwortlich sein könnten. Für humane periphere Blutmonozyten (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMC) ist dieser Effekt 2005 gezeigt worden (Sioud 2005). Wie beschrieben haben die siLuc und siGal ebenso wie die siNC der Firma Qiagen keinen murinen Ursprung und somit keine Ziel-mRNA, welche mittels RNA-Interferenz abgebaut werden kann. Zur *Knockdown*-Kontrolle diente aus diesem Grund die siApoB, welche komplementär zum Apolipoprotein B ist. Der spezifische *Knockdown* von ApoB durch die siApoB und siApoB-Chol zeigte, dass die Transfektion erfolgreich war und die verwendeten siRNAs neben ihren immunstimulatorischen Eigenschaften auch funktionell sind. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Knockdown* Effizienzen von siApoB und siApoB-Chol vorlagen, ist davon auszugehen, dass die Modifikationen durch Cholesterol keine Auswirkung auf die Funktionalität einer siRNA hat.

Diese *in vitro* Analysen zeigten, dass sich das Set aus siRNAs als Werkzeug für die *in vivo* Versuche eigneten: die siLuc diente als Kontroll-siRNA, die siGal als immunstimulatorische Kontrolle und die siApoB als *Knockdown*-Kontrolle. Anhand der hepatischen ApoB Expression ließ sich die *Knockdown* Effizienz der LNP01 formulierte siApoB *in vivo* im Zeitverlauf und in allen Leberlappen verfolgen. Der gleichmäßige ApoB *Knockdown* in allen Leberlappen zeigte eine gleichmäßige Verteilung der siRNA nach systemischer, intravenöser Applikation. Genau wie *in vitro* induziert die siGal *in vivo* in der gesamten Leber eine Ifn- $\beta$  Expression. Tnf- $\alpha$  wird in der gesamten Leber sowohl durch siGal, als auch siApoB verstärkt exprimiert. Der immunstimulatorische Effekt erfolgte sechs Stunden nach Applikation und war auch in anderen Organen wie Milz und Niere, sowie im Herzen zeitverzögert nachweisbar. Die initial transient erhöhten Chemokinlevel in den mit siRNA behandelten Tieren führen zur Rekrutierung und Differenzierung von Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten (Ajuebor *et al.* 2002; Gangur *et al.* 2002), welche die NPC-vermittelte Immunantwort möglicherweise induzierten. Der leichte, nicht signifikante Anstieg der Lebertransaminasen nach Gabe der siRNA weist auf eine nur geringe Lebertoxizität hin, unterstützt durch die unauffällige Histologie der Lebern. Die zusätzliche Administration von PolyI:C führte in dem durch siGal vorstimuliertem System nicht zu einer weiteren Induktion der gemessenen Parameter. Dies mag daran liegen, dass die maximale Induktion der hepatischen Immunantwort alleine durch die initiale Aktivierung durch die siGal erreicht war. Validierend zu den *in vitro* Daten reagierte *in vivo* der Mix aus nicht-parenchymalen Leberzellen verstärkt durch die Expression verschiedener Zytokine auf die siGal, während die Hepatozyten vergleichsweise keine oder kaum eine Immunantwort aufwiesen. Die in den Hepatozyten exprimierten ISGs sind eine Reaktion auf die von den NPC produzierten IFNs. Der Mix aus nicht-parenchymalen Leberzellen bestand nachweislich aus LSEC, KC, HSC, natürlichen Killer (NK) Zellen und T-Zellen, Komponenten des zellulären Immunsystems (Broering, Lu & Schlaak 2011). Diese Zellen haben *in vivo* den ersten Kontakt mit der siRNA, zudem sind sie darauf spezialisiert, zwischen körpereigenen und -fremd zu unterscheiden.

Die Chloroquinbehandlung *in vitro* zeigte, dass endosomale Komponenten an der Erkennung von siRNAs beteiligt sind, die Verwendung von TLR3 bzw. Myd88 *Knockout* Mäusen sollte diese Hypothese näher spezifizieren. Mit Ausnahme von TLR3 sind alle anderen TLRs MyD88-abhängig. Der endosomale TLR9 detektiert

DNA (Li *et al.* 2012), TLR3 ist dafür bekannt, dsRNA zu erkennen (Alexopoulou *et al.* 2001) und TLR7 und -8 erkennen ssRNA (Lan & Kandimalla 2011). TLR13 ist als muriner, endosomaler Rezeptor identifiziert, welcher über einen Myd88-abhängigen Signalweg und NF- $\kappa$ B Aktivierung, Nukleinsäuren detektiert (Shi *et al.* 2011). Wahrscheinlich ist bakterielle RNA der natürliche Ligand von TLR13 (Hidmark *et al.* 2012). Die in dieser Arbeit generierten Daten zeigen, dass die durch LNP01-formulierte siRNA induzierte Immunantwort *in vivo* TLR3-unabhängig ist, jedoch ein MyD88-abhängiger Signalweg involviert zu sein scheint. In den MyD88 *Knockout* Mäusen war nach siGal Applikation keine Induktion der Ifn- $\beta$  Expression detektierbar im Gegensatz zu den C57BL/6 oder TLR3 *Knockout* Tieren. Es ist beschrieben, dass die Induktion der IFN Antwort eigentlich TLR7-abhängig ist (Hornung *et al.* 2005) und durch die 2'-O-methylierung (siLuc) inhibiert werden kann (Hamm *et al.* 2010). Auch die Il-6 Expression wurde in den MyD88 *Knockout* Mäusen nach siGal nicht induziert. Für B-Lymphozyten ist beschrieben worden, dass die Il-6 Produktion nach TLR7 Stimulation von der Aktivität der cJun-Kinase JNK bzw. der Phosphorylierung von cJun abhängig ist (Vanden Bush & Bishop 2008). Die Analysen von gesamt Leberextrakt der siGal injizierten Mäusen zeigten eine verstärkte Expression, sowie Phosphorylierung von cJun in C57BL/6 und TLR3 *Knockout* Mäusen, nicht aber in den MyD88 *Knockout* Tieren, was für eine MyD88-anhängige Il-6 Expression in diesen Tieren spricht. Generell reagierten die TLR3 *Knockout* Mäuse intensiver auf die siGal als die WT Tiere (C57BL/6). Dies zeigte der Western Blot mit einer detektierbaren JNK Phosphorylierung in TLR3<sup>-/-</sup> Mäusen, welche in WT Mäusen nicht detektierbar war. Auch die Ifn- $\beta$  und Il-6 Expression war in den TLR3<sup>-/-</sup> Mäusen verstärkt, im Vergleich zu den WT Tieren. Eventuell reagieren diese Tiere auf Grund des fehlenden TLR3 sensibler auf Stimuli der anderen TLRs.

In anderen Arbeiten ist auch der TLR3 als Rezeptor für siRNAs identifiziert worden (Cho *et al.* 2009; Kleinman *et al.* 2008), dies mag an dem unterschiedlichen experimentellen Design liegen. Es wurden siRNA Sequenzen mit unterschiedlichem immunologischen Potenzial verwendet, dass durch spezielle Sequenzmotive bestimmt wird (Zamanian-Daryoush *et al.* 2008). Zudem spielen die Modifikationen, die Nukleotidlänge sowie die verschiedenen Trägermoleküle (*delivery tools*) eine Rolle. Zusätzlich ist das immunologische Potenzial von den verschiedenen verwendeten Zelltypen abhängig.



Somit zeigt diese Arbeit, dass systemisch applizierte LNP01-formulierte siRNA durch einen MyD88-abhängigen, cJun induzierten Signalweg in den nicht-parenchymalen Zellen der Leber detektiert wird und dort eine Immunreaktion auslöst, welche durch Ribose-Modifikation am siRNA Rückgrat unterbunden werden kann.

## 4.2 Die Vorteile des Isg15 *Knockdowns* in der HCV Therapie

Nachdem sich der erste Teil dieser Arbeit mit den Auswirkungen von siRNA auf das hepatische Immunsystem beschäftigt hat, beschreibt der nachfolgende Teil den Einsatz von siRNA im Mausmodell in Bezug auf die HCV Therapie. In HCV Patienten hat eine erhöhte ISG/ISG15 Expression zwei Konsequenzen: zum Ersten reagieren die Hepatozyten nicht mehr adäquat auf exogenes IFN, wenn die ISG/ISG15 Expression schon vor der Therapie erhöht war (Chen, Borozan, *et al.* 2010). Hierbei schwächt ISG15 die effiziente IFN-Antwort in diesen Zellen ab (Broering *et al.* 2010; Chua *et al.* 2009). Zum Zweiten wird die HCV-Replikation direkt durch ISG15 unterstützt, denn ISG15 wurde als pro-viraler Wirtsfaktor in der HCV-Replikation identifiziert (Broering *et al.* 2010; Chen, Sun, *et al.* 2010).

Der Mechanismus der RNA-Interferenz bietet hier eine Möglichkeit zur HCV Therapie. In dem der Wirtsfaktor Isg15 durch einen siRNA-vermittelten *Knockdown* in der Leber reduziert wird, könnte die HCV Viruslast direkt reduziert und zusätzlich das Ansprechen auf die IFN Therapie erhöht werden. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass *in vivo* im Mausmodell ein hepatischer *Knockdown* nach systemischer Applikation der LNP01-siRNA möglich war. Des Weiteren stellen sich die Fragen, welche Organe und Zelltypen von einem *Knockdown* betroffen sind und ob ein Isg15 *Knockdown in vivo* auch die Antwort auf IFN verstärken kann.

Da Isg15 *Knockout* Mäuse (Isg15<sup>-/-</sup>) keinen auffälligen Phänotyp im Hinblick auf Letalität oder Fertilität aufweisen (Osiak *et al.* 2005), scheint Isg15 nicht essentiell für zelluläre Prozesse zu sein. Damit kann ausgeschlossen werden, dass eine hepatische Suppression des Isg15 schwerwiegende Komplikationen hervorrufen würde. Von der Firma Roche Kulmbach GmbH (heute Axolabs GmbH) wurden uns drei sequenzidentische Isg15-spezifische siRNAs zur Verfügung gestellt, welche sich durch ihre verschiedenen Ribose-Modifikationen unterscheiden: unmodifiziert, 2'O-methyliert oder 2'fluoriert. Diese sollen die Serumstabilität der siRNAs *in vivo*

erhöhen (Choung *et al.* 2006) und mögliche Immunreaktionen unterbinden (Broering *et al.* 2013). Zunächst zeigte die Transfektion in murinen Hepatomzelllinien, dass alle drei siRNAs, unabhängig von ihrer Modifikation, einen spezifischen Isg15 *Knockdown* induzieren konnten. Dieser führte in der HCV subgenomischen Replikon Zelllinie MH1 zu einer Suppression der HCV-Replikation. Ähnliche Isg15 Suppressionsraten waren auch in den verschiedenen primären Leberzellen *in vitro* nach der Transfektion detektierbar. Das zeigt, dass eine effektive silsg15 Suppression vorlag, die Ribose-Modifikationen keinerlei Auswirkungen auf die *Knockdown* Effizienzen hatten und dass Isg15 in allen untersuchten Leberzellen (PMH, LSEC und KC) exprimiert wird.

Die *in vivo* Applikation dieser siRNAs als LNP01-Formulierung führte ebenso für alle Isg15 siRNAs zu einem signifikanten *Knockdown* in der Leber, der im Mittel bei 80% lag. Dieser war ab dem zweiten Tag nach Applikation detektierbar und hielt über zehn Tage stabil an. Für LNP-formulierte siRNAs ist ein Suppressionszeitraum von drei Wochen nach einmaliger Applikation beschrieben (Frank-Kamenetsky *et al.* 2008). Bezieht man diese Ergebnisse auf die Anwendung am Patienten, bedeutet eine intravenöse Injektion zwar den Nachteil einer ambulanten Behandlung, aber es wäre eventuell nur eine Injektion bzw. Infusion monatlich notwendig.

Auch für die verschiedenen Isg15 spezifischen siRNAs wurde sechs Stunden nach Applikation die Immunantwort der Leber untersucht. Hier zeigte sich, dass die unmodifizierte siRNA die Expression von Ifn- $\beta$  induzierte, die methylierte oder fluorierte Variante jedoch nicht. In Milz und Niere war der gleiche Effekt sichtbar, was auf die von der Leber ausgeschütteten Zytokine im Serum zurück zu führen sein könnte (siehe oben), wobei in keinem dieser Organe ein Isg15 *Knockdown* detektierbar war. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch verschiedene Ribose-Modifikationen das immunstimulatorische Potenzial von siRNAs inhibiert werden kann (Chiu & Rana 2003; Jackson *et al.* 2006; Broering *et al.* 2013). Ob die Therapie das Immunsystem aktivieren soll oder eben dieser Effekt vermieden werden sollte, ließe sich durch die Wahl der siRNA bzw. ihrer Modifikation bestimmen. Zudem zeigen die Ergebnisse das ausschließlich leberspezifische Wirkspektrum der LNP01-Formulierung, welches der Therapie der hepatotropen Hepatitiden zu Gute kommen würde (Bowden *et al.* 1996). Weitere Analysen von primären murinen Hepatozyten (PMH) und nicht-parenchymalen Zellen (NPC) aus silsg15 injizierten Mäusen ergaben, dass der Isg15 *Knockdown* nicht nur leberspezifisch war, sondern

ausschließlich in den Hepatozyten stattfand. Wie in Teil I beschrieben und diskutiert, wurde auch hier die Immunreaktion nach sechs Stunden ausschließlich von den nicht-parenchymalen Zellen ausgelöst.

Nach dem hepatischen Isg15 *Knockdown* zeigten die Mäuse ein signifikant höheres Ansprechen auf endogenes sowie exogenes IFN. Diese Experimente bestätigen die *in vitro* Ergebnisse, dass Isg15 ein Hemmer der IFN-Antwort ist (Chua *et al.* 2009; Broering *et al.* 2010). Interessanterweise war die Isg15-Protease, Usp18, nach der Isg15 Langzeit-Suppression *in vivo* auch herunter reguliert. Hier könnte eine Autoregulation vorliegen, also eine eingeschränkte Usp18 Expression, weil die Expression des Substrates reduziert war. Als ISG wird USP18 auch durch IFN induziert, aber durch seine Funktion als Negativregulator des Jak/STAT Signalweges, sprechen die Zellen danach nicht mehr auf IFN- $\alpha$  an, sie werden refraktär (Makowska *et al.* 2011). Auch die direkte Usp18 Suppression ist mit einer verstärkten IFN Empfindlichkeit beschrieben (Randall *et al.* 2006). Das verwendete Interferon ist ein Consensus Interferon alpha, ein nicht-natürlich vorkommendes, synthetisch hergestelltes Ifn- $\alpha$ , welches zur Therapie von HCV entwickelt wurde (Melian & Plosker 2001). Diese Daten zeigen, dass Consensus IFN *in vitro* sowie *in vivo* eine Reaktivität in Mäusen besitzt.

Die Analyse von siISG15 injizierten, humanisierten und HCV infizierten PXB Mäusen ergab, dass auch humane Hepatozyten nach systemischer Applikation durch die LNP01-Formulierungen erreicht wurden und ein spezifischer ISG15 *Knockdown* erzielt werden konnte. Anhand dieses ISG15 *Knockdowns* konnte hier erstmals die HCV-Replikation *in vivo* supprimiert werden. Dies ist ein weiterer, wichtiger Schritt für den Einsatz von siISG15 im Patienten, es muss ein geeignetes Trägermaterial zur Verfügung stehen, welches auch für humane Hepatozyten spezifisch ist. Die humanisierten Mäuse waren 2012 das einzige verfügbare replizierende HCV Mausmodell (Ploss & Rice 2009). Nach der Repopulation der Leber mit humanen Hepatozyten ist es möglich, die Tiere bzw. die humanen Hepatozyten, mit HCV (Mercer *et al.* 2001) oder HBV (Dandri *et al.* 2001) zu infizieren. Nach experimentellem Abschluss dieser Arbeit wurde erstmals in genetisch humanisierten Mäusen eine *de novo* Synthese von infektiösen HCV Partikeln beschrieben (Dorner *et al.* 2013). In diesen Mäusen, welche die humanen Proteine CD81 und Occludin (OCLN) als minimalstes Set an humanen *Entry*-Faktoren exprimierten, war zunächst nur der Virus-Eintritt, jedoch keine Replikation nachgewiesen worden (Dorner *et al.*

2011; Dorner *et al.* 2012). Die siSG15 könnte in der HCV Therapie in Kombination mit IFN verabreicht werden, wodurch die HCV-Replikation supprimiert würde und zusätzlich die Antwort auf das exogene IFN verstärkt wäre, aber auch eine IFN-freie Behandlung (*IFN-free regimens*) mit der siSG15 wäre möglich, da auch die Antwort auf endogenes IFN durch den ISG15 *Knockdown* verstärkt wird. Aufgrund der IFN-induzierten Nebenwirkungen ist die IFN-freie Behandlung das Ziel der HCV Therapie (Schlaak *et al.* 2012). Um dies zu erreichen, werden DAAs eingesetzt, mittlerweile auch ohne die Kombination mit IFN/RBV. Bei dem Einsatz von DAAs, die z.B. eine Inhibierung der viralen Polymerase oder Protease bewirken, können sich Resistenzen entwickeln (Foster *et al.* 2011; Chayama *et al.* 2012). Die Kombination verschiedener DAAs, vor allem der „neuen Generation“ kann die Entstehung resistenter Viren reduzieren. Zu den aktuellen DAAs gehören der nukleotidische Polymerase-Inhibitor Sofosbuvir (Zulassung 01/2014), die Protease Inhibitoren Simeprevir und Faldaprevir und der NS5A Inhibitor Daclatasvir, die Zulassung für Letztere wird im Laufe des Jahres (2014) erwartet (Mariño *et al.* 2014).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Kombination aus siSG15 und einem DAA, hier BILN2061, einen synergistischen Effekt auf die Suppression der HCV-Replikation haben. Das Langzeit-Experiment bestätigte, dass HCV subgenomische Replikon Zellen unter BILN2061 Therapie eine Resistenz ausbilden, wie schon gezeigt (Lin *et al.* 2004), diese aber durch die Kombination mit siSG15 verzögert wenn nicht sogar unterbunden werden konnte.

Es konnte gezeigt werden, dass ein spezifischer Isg15 *Knockdown* in unterschiedlichen Mausmodellen, zielgerichtet in murinen und humanen Hepatozyten möglich ist. Die Ribose-Modifikationen der siRNAs verhindern auch hier die Aktivierung einer Immunantwort. Der Isg15 *Knockdown* führt auch *in vivo* zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber endogenem und exogenem Interferon und supprimiert die HCV-Replikation in HCV infizierten Mäusen. Diese Eigenschaften der siSG15/siSG15 bieten, kombiniert mit DAAs, weitere vielversprechende Therapiestrategien in der Behandlung der Hepatitis C Infektion.

### 4.3 Die pro-virale Funktion von Isg15 in der HCV-Replikation wird durch verschiedene Effektorproteine vermittelt

Obwohl seit 1979 bekannt ist, dass Isg15 eine Ähnlichkeit zu Ubiquitin und die damit verbundene Eigenschaft an zelluläre Proteine zu binden, aufweist (Dao & Zhang 2005), war dessen Bedeutung im Rahmen der HCV-Replikation noch unbekannt. Die funktionelle Analyse im murinen System hat fünf Proteine identifiziert, welche nach Isg15 Suppression reduziert waren: *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3* (Hnnp A3), *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (Hnnp K), *Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase* (Hmgcs1), *Isocitrate dehydrogenase cytoplasmic* (Idh1) und *Thioredoxin domain-containing protein 5* (Txndc5). Diese Proteine können zwei Gruppen zugeordnet werden, die eine Gruppe spielt eine Rolle im Lipid Metabolismus, dazu gehören Hmgcs1, Txndc5 und Idh1, die andere Gruppe wird durch Mitglieder der Hnnp Familie repräsentiert, Hnnp A3 und Hnnp K. Jeder dieser fünf Kandidaten könnte den HCV pro-viralen Effekt von Isg15 vermitteln.

Für den HCV „Lebenszyklus“, bestehend aus Eintritt in die Zelle (*entry*), Replikation, Zusammenbau der Viruspartikel (*assembly*) und die Entlassung der Partikel aus der Wirtszelle (*release*), ist der zelluläre Lipid Metabolismus unverzichtbar. Das HCV core Protein und der RNA Replikationskomplex sind stark mit Fetttröpfchen (*lipid droplets*, LD) assoziiert (Miyazawa *et al.* 2007), welche auch bei der Produktion von viralen Partikeln und deren Entlassung eine Rolle spielen (Coller *et al.* 2012). Die virale Replikation sowie die Protein Synthese führen zu ER (endoplasmatisches Retikulum) Stress (Tardif *et al.* 2002), welcher für die Zelle tödlich sein kann. Das Hepatitis-C-Virus muss dem vorbeugen, um die Apoptose der Wirtszelle zu verhindern. Nach dem Isg15 *Knockdown* war Txndc5 auf transkriptioneller sowie auf Proteinebene reduziert. Txndc5 gehört zur Thioredoxin-Familie und wird mit der Regulation von ER Stress assoziiert (Jessop *et al.* 2009). Außerdem ist die Txndc5 Expression direkt mit dem hepatischen Fettgehalt assoziiert und spielt eine Rolle in der ApoB Kontrolle, sowie in der Entwicklung von Steatose in ApoE *Knockout* Mäusen (Ramírez-Torres *et al.* 2012), was möglicherweise auch einen Einfluss auf den HCV-Replikationskomplex haben kann (Bartenschlager *et al.* 2011).

Hmgcs1 genau wie Hmgcr (HMG CoA Reduktase) sind Bestandteile des Mevalonat Signalweges. Dieser stellt für die Cholesterol Synthese notwendige Produkte zur Verfügung (Nakamura *et al.* 2009). Es konnte gezeigt werden, das HCV infizierte

humanisierte Mäuse eine vermehrte Hmgcs1 Expression aufwiesen (Walters *et al.* 2006). Zudem ist bekannt, dass die Blockade des Mevalonat Signalweges mit Hmgcr Inhibitoren (Statinen) (Ye *et al.* 2003) oder mit dem Hmgcs1 Inhibitor Ceestatin zu einer Suppression der HCV-Replikation führt (Delang *et al.* 2009; Peng *et al.* 2011). Der siRNA-vermittelte *Knockdown* von Hmgcs1 hatte in dieser Arbeit keinen direkten Effekt auf die HCV-Replikation; dennoch wurde für andere HCV Zellkulturmodelle (OR6 und JFH1) beschrieben, dass der Hmgcs1 *Knockdown* die HCV-Replikation supprimiert (Peng *et al.* 2011).

Genauso wie der Mevalonat Signalweg wird auch Idh1 durch Sterole reguliert und durch *sterol regulatory element binding proteins* (Srebps) aktiviert (Shechter *et al.* 2003). Srebps sind die Schlüsselenzyme der Cholesterol und Fett-Säure Biosynthese, sie arbeiten integriert in die ER Membran als zelluläre Cholesterol Sensoren (Xiao & Song 2013). Es wurde gezeigt, dass durch Blockade des Srebp Signalweges die Etablierung der HCV-Infektion inhibiert werden konnte (Olmstead *et al.* 2012). Genau wie Srebp-2, reguliert auch Isg15 die Idh1 Expression und hat möglicherweise dadurch den gleichen Effekt auf die HCV-Replikation.

Die zweite regulierte Proteingruppe, die in dieser Studie identifiziert wurde, gehört zur Familie der *heterogenous nuclear ribonucleoproteine*. Die Hnrnp sind RNA bindende Proteine, welche sich zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und her bewegen. Sie sind als HCV IRES bindende Proteine identifiziert worden, die dort die Translation unterstützen: Hnrnp A1 (Kim *et al.* 2007), Hnrnp D (Paek *et al.* 2008), Hnrnp E2/PCBP2 (Fukushi *et al.* 2001; Wang *et al.* 2011), Hnrnp L (Hwang *et al.* 2009) und Hnrnp M (Yao *et al.* 2011). Einige dieser Proteine können zusätzlich noch an die 3'UTR (*untranslated region*) des HCV binden: Hnrnp A1 (Kim *et al.* 2007), Hnrnp E2/PCBP2 (Wang *et al.* 2011), Hnrnp I/PTB (Chung & Kaplan 1999), Hnrnp L (Hwang *et al.* 2009) und Hnrnp C (Gontarek *et al.* 1999). Damit spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Regulierung der HCV-RNA-Replikation durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5b, welche ihrerseits auch direkt mit Hnrnp A1 interagiert (Kim *et al.* 2007). Des Weiteren ist bekannt, dass Hnrnp E2 durch die Bindung an die 3' und 5'UTR in die Zirkularisierung der HCV RNA involviert ist. Hnrnp E2 weist eine hohe Homologie zu Hnrnp K auf (Wang *et al.* 2011). Hnrnp K interagiert mit dem HCV core Protein (Hsieh *et al.* 1998) und ist in Huh7 Zellen, in welchen das komplette HCV Genom repliziert, signifikant

hochreguliert (Mannová *et al.* 2006). Diese Arbeit zeigt, dass Hnrnp K durch Isg15 translational reguliert wird. Der Isg15 *Knockdown* führt *in vitro* sowie *in vivo* zur Hnrnp K Suppression, die Überexpression von Isg15 *in vitro* führte umgekehrt zu einer gesteigerten Hnrnp K Transkription und Translation sowie zu einer gesteigerten HCV-Replikation. Zusätzlich hat die siRNA-vermittelte Suppression von Hnrnp K im murinen HCV subgenomischen Replikon System MH1 eine Reduktion der HCV-Replikation bewirkt. Diese Ergebnisse konnten im humanen JFH1 validiert werden (Real *et al.* 2013). In Ko-Immunpräzipitationsexperimenten ist schon 2005 gezeigt worden, dass Mitglieder der Hnrnp-Familie Substrate von Isg15 sind, unter ihnen waren auch Hnrnp L und Hnrnp K (Zhao *et al.* 2005). Damit konnte mit Hnrnp K ein direkter Regulator der HCV-Replikation und das fehlende Bindeglied zwischen Isg15 und HCV identifiziert werden. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass der *Knockdown* von Usp18, der Isg15 Protease, in einer verstärkten Hnrnp K Expression resultiert (Duex *et al.* 2011), zusätzlich zeigt eine weitere Publikation, dass der Usp18 *Knockdown* die Isg15 Expression steigert (Murray *et al.* 2011). Auch diese Erkenntnisse verstärken den hier dargestellten direkten Zusammenhang zwischen Isg15 und Hnrnp K.

Ein weiteres Isg15-reguliertes Hnrnp-Familien Mitglied war Hnrnp A3, dessen siRNA-vermittelte Suppression keinen direkten Effekt auf die HCV-Replikation zeigte. Es ist aber beschrieben worden, dass Hnrnp A3 mit Hnrnp M und Hnrnp L assoziiert ist (Papadopoulou *et al.* 2012), welche wiederum als HCV IRES bindende Faktoren identifiziert worden sind. Aus diesem Grund ist es sehr gut möglich, dass auch Hnrnp A3 mit dem Ribonukleoprotein Komplex interagiert.

Im humanen HCV Replikon System con1 konnten auf Transkriptionsebene sogar alle sieben Kandidaten Proteine nach Isg15 Suppression als reduziert validiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, wie ähnlich sich das humane und murine System sind und somit auch in murinen Systemen relevante Ergebnisse in der HCV Forschung erlangt werden können, welche dennoch im humanen System validiert werden sollten.

Der einzelne siRNA-vermittelte *Knockdown* aller sieben Kandidaten Proteine hat gezeigt, dass die Psma6 Suppression die Isg15 Expression steigert. Die Kombination aus silsg15 und siPsma6 konnte zudem den suppressiven Effekt von Isg15 auf die HCV-Replikation inhibieren. Psma6 ist Teil des Proteasoms, eine multikatalytische Proteinase, die sich aus vielen verschiedenen Untereinheiten zusammen setzt, unter

anderem aus Psma6 und Psma7 (Elenich *et al.* 1999), wobei Psma7 schon als Substrat von Isg15 identifiziert worden ist (Zhao *et al.* 2005). Gleichzeitig wurde Psma7 auch als translationaler Initiationsfaktor für die HCV IRES Aktivität beschrieben. Die genauen zellulären Zusammenhänge zwischen Isg15, Psma6 und HCV müssten allerdings noch näher charakterisiert werden.

Die Suppression von Isg15 beeinflusst viele zelluläre Prozesse, die ganz unterschiedlich in die HCV-Replikation involviert sind. Trotzdem müssen die molekularen Interaktionen noch genauer determiniert werden. Die in dieser Arbeit generierten Daten zeigen, dass Isg15 die Expression von Proteinen reguliert, deren direkte Auswirkungen auf die HCV-Replikation schon beschrieben worden sind. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass der pro-virale Effekt von Isg15 auf die HCV-Replikation durch diese Effektorproteine vermittelt wird. Diese Resultate haben eine potentielle Relevanz für die Entwicklung von neuen Therapieoptionen für HCV Patienten, da die RNAi-vermittelte ISG15 Suppression den HCV-Replikationskomplex an verschiedenen Stellen inhibieren könnte. Zusätzlich tragen diese Ergebnisse auch zu einem besseren Verständnis der zellulären Isg15-Funktion bei.

#### **4.4 Die angeborene Immunantwort in HBVtg Mäusen mit einem Defizit für das *small* HBsAg ist *Toll-like* Rezeptor 3 abhängig**

In den untersuchten HBV Tg1,4 HBV-S-mut(3) Mäusen war zunächst auffällig, dass die HBV-Replikation in männlichen Tieren signifikant verstärkt war. Für Mäuse, welche transgen für Murmeltier-Hepatitis (*woodchuck hepatitis virus*, WHV) sind, ist der geschlechterspezifische Unterschied in der Virus-Replikation schon genauso beschrieben worden (Meng *et al.* 2014). Ebenso unterschieden sich in den HBVtg Mäusen die Zytokinexpressionsmuster zwischen männlichen und weiblichen Tieren, wobei die Weibchen, unabhängig vom Genotyp, eine erhöhte Zytokinexpression aufwiesen. Es ist beschrieben, dass die Il-6 Sekretion von NPC, die HBV-Replikation in den Hepatozyten auf der Ebene der Transkription kontrolliert (Hösel *et al.* 2009). Auch ist bekannt, dass Tnf- $\alpha$  die HBV-DNA-Replikation supprimiert und das Nukleocapsid destabilisiert (Biermer *et al.* 2003; Puro & Schneider 2007). Die verstärkte Expression von Il-6 und Tnf- $\alpha$  in weiblichen Mäusen, HBVtg wie WT,



könnte somit der Grund für die reduzierte HBV-Replikation in weiblichen HBVtg Tieren sein.

Unabhängig vom Geschlecht war in den HBVtg Tieren die IFN/ISG Expression signifikant verstärkt, verglichen mit WT Tieren. In Patienten findet man diese erhöhte Expression nicht, vielmehr blockieren HBV-Komponenten zelluläre Mechanismen, unter anderem die *Toll-like* Rezeptor Signalwege und hemmen somit das Auslösen einer anti-viralen Immunreaktionen (M. Wu *et al.* 2007; Wu *et al.* 2009; Wei *et al.* 2010; Yu *et al.* 2010). Da in den HBVtg Mäusen kein *small* HBsAg produziert wird, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass das sHBs für die Suppression der Immunantwort verantwortlich sein könnte. Das *small* HBsAg ist für die Produktion der viralen Partikel notwendig, aus diesem Grund sind die HBVtg Tiere auch nicht infektiös (Bruss & Ganem 1991). Weiterhin werden mit dem *small* HBsAg kleine subvirale Partikel gebildet. Diese werden ins Serum abgegeben und erreichen dort in infizierten Patienten 10.000-fach höhere Konzentrationen als die Virus-Partikel selber. Dies dient dem Abfangen von HBs-spezifischen Antikörpern (Patient *et al.* 2007). Generell wiesen die Tiere keine erhöhten Transaminasen auf und entwickelten kein hepatozelluläres Karzinom (HCC). Auch dies lässt sich auf das fehlende sHBs zurückführen bzw. könnte durch die geringen Mengen an nicht-sekretiertem *large* und *mittel* HBs in der Leber verursacht sein (Halverscheid *et al.* 2008). Transgene Mäuse (Tg(Alb1-HBV)Bri44), welche nur das IHBs exprimieren, entwickeln sehr zuverlässig ein HCC, wenn das IHBs in großen Mengen in der Leber akkumuliert (Chisari *et al.* 1989).

Die im Mausmodell eingesetzte siRNA gegen das HBxAg (siHBx-9030) führte zu einer signifikanten Suppression der hepatischen HBV-RNA, -DNA und des HBcAg sowie des im Serum detektierbaren HBeAg. Da die Sequenz des X Antigens Bestandteil aller HBV-mRNAs ist, wird mit einer funktionellen HBx-gerichteten siRNA, eine Reduktion aller mRNA-Intermediate bewirkt. Dies wirkt sich folglich negativ auf die Replikation, sprich DNA-Synthese und Proteintranslation aus. Mit Hilfe der spezifischen HBV-Suppression konnte gezeigt werden, dass die IFN/ISG Antwort durch die HBV-Replikation induziert war. Äquivalent zu der reduzierten HBV-Replikation sanken auch die IFN/ISG Level wieder auf wildtypisches Niveau.

Zu den induzierten hepatischen ISGs gehörte auch Isg15. Im vorangegangenen Teil dieser Arbeit wird der Effekt des Isg15 *Knockdowns* bzw. der Überexpression auf die

Expression von Hnrnp K und Hmgcs1 beschrieben. Da beide Faktoren in der Literatur auch in Zusammenhang mit der Hepatitis-B-Infektion gebracht werden, wurde ihre Expression auch im HBVtg Mausmodell analysiert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass in den HBVtg Mäusen sowohl Hnrnp K als auch Hmgcs1 signifikant erhöht waren und durch den Einsatz von HBx-spezifischer siRNA auf ein wildtypisches Niveau gesenkt werden können, äquivalent zur Isg15 Expression.

Hnrnp K ist ein RNA bindendes Protein, welches sich zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und her bewegt (Krecic & Swanson 1999). *In vitro* führt die Hnrnp K Überexpression zu einer gesteigerten HBV-Replikation und umgekehrt supprimiert der Hnrnp K *Knockdown* die HBV-Replikation (Ng *et al.* 2005). Somit scheint Hnrnp K eine pro-virale Funktion sowohl in der HCV- als auch in der HBV-Replikation einzunehmen.

Wie unter 4.3 beschrieben ist Hmgcs1 Bestandteil des Mevalonat Signalweges, welcher durch Sterole reguliert und durch *sterol regulatory element binding proteins* (Srebps) aktiviert wird (Shechter *et al.* 2003). Er liefert wichtige Bestandteile für die Cholesterol Synthese (Nakamuta *et al.* 2009). Es ist publiziert, dass das HBxAg die Srebp-1c Expression erhöht und damit die Fettsäuresynthese (Lipogenese) in der Leber verstärkt (Kim *et al.* 2008). Auch die Effizienz des Virus, Hepatozyten zu infizieren, ist vom Cholesterolgehalt in der Virushülle abhängig (Bremer *et al.* 2009). Durch die Inhibierung des Mevalonatweges und damit der Cholesterolsynthese mittels z. B. Statine können Hepatiden in ihrer Replikation gehemmt werden (Bader & Korba 2010; Pollock *et al.* 2010), zusätzlich kann der Entstehung eines HCCs vorgebeugt werden (Tsan *et al.* 2012). In wie weit die Hmgcs1 Induktion in HBVtg Mäusen Isg15-abhängig oder –unabhängig ist, wäre noch zu untersuchen. Ebenso, ob sich eine Hmgcs1 Suppression auf die HBV-Replikation auswirken würde. Bisher ist publiziert worden, dass die Aktivität von Isg15 oder die ISGylierung keinen Effekt auf die HBV-Replikation hat, gezeigt in ISGylierungs-defizienten Mäusen (Ube1L<sup>-/-</sup>). Welche Auswirkungen der direkte siRNA-vermittelte Isg15 *Knockdown* auf die HBV-Replikation hätte, ist bisher nicht bekannt.

Während die HBV abhängige Induktion der IFN/ISG Expression im Zeitverlauf sanken, stieg die hepatische IFN- $\gamma$  Expression zunehmend an. IFN- $\gamma$  wird von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK) sezerniert und dient der direkten Inhibierung viraler Replikation, sowie der Aktivierung von Makrophagen. Das anti-

virale Zytokin IFN- $\gamma$  ist, neben TNF- $\alpha$ , eines der Hauptvermittler in der Inhibition der HBV-Replikation (Schultz & Chisari 1999; Reifenberg *et al.* 2006). Zudem ist in Ratten gezeigt worden, dass sowohl IFN- $\gamma$  als auch IFN- $\beta$  eine inhibierende Wirkung auf die Sternzell-Proliferation haben (Shen *et al.* 2002). In chronisch-infizierten HBV Patienten mit fortschreitender Fibrose reduzierte die IFN- $\gamma$  Behandlung sogar den Fibrosegrad (Weng *et al.* 2005). Die Leberfibrose ist eine häufige Entwicklungsgrundlage für ein hepatozelluläres Karzinom (HCC). Eine Fibrose entsteht durch die Aktivierung hepatischer Sternzellen, welche anfangen, unkontrolliert Kollagen zu produzieren, um apoptotische oder auch nekrotische Bereiche der Leber aufzufüllen und zu stabilisieren (Friedman 2008). Ein Marker für aktivierte Sternzellen und damit ein Fibrose-Indikator ist das Glatte-Muskel-Aktin (*smooth muscle actin*,  $\alpha$ -Sma) (Akpolat *et al.* 2005). Die Expression von  $\alpha$ -Sma war in den HBVtg Tieren signifikant reduziert. Das liefert eine weitere Erklärung, warum diese Mäuse weder eine Fibrose noch ein HCC bekommen.

Wie zuvor beschrieben, war in dem HBVtg Mausmodell die Ifn- $\beta$  Expression signifikant erhöht, was eine TLR3 vermittelte Stimulation vermuten ließ. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden HBVtg mit TLR3 *Knockout* Mäusen gekreuzt. In diesen Hybriden war weder eine verstärkte IFN, noch eine verstärkte ISG Expression detektierbar. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese der TLR3 vermittelten, HBV-induzierten IFN/ISG Antwort. Interessanterweise ist gezeigt, dass auf Leberzellen und auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), speziell auf den „Monozyten *derived* dendritischen Zellen“, von CHB Patienten, der TLR3 signifikant weniger exprimiert wird, als auf Zellen von den Gesund-Kontrollen. Aufgrund dessen ist auch die IFN- $\beta$  Produktion in diesen Patienten reduziert. Durch die Behandlung mit Interferon erholt sich die Expression des TLR3 aber wieder (Li *et al.* 2009; Huang *et al.* 2013). Im Gegensatz zu CHB Patienten unterschied sich die Expression des TLR3 nicht in Lebern von HBVtg oder WT Mäusen, jedoch war die HBV-RNA signifikant erhöht in den HBVtg/TLR3<sup>-/-</sup> Tieren, verglichen zu HBVtg. Diese Ergebnisse zeigen, dass der TLR3 Signalweg bzw. das aktivierte Immunsystem die HBV-Replikation kontrolliert. Die Stimulation der HBVtg Tiere mit dem TLR3 Liganden PolyI:C induzierte eine signifikante Immunantwort. Das bedeutet, eine TLR3-vermittelte Signalweiterleitung ist in den HBVtg Tieren ohne HBsAg aktivierbar, aber verglichen mit den WT Tieren war diese Immunantwort dennoch signifikant reduziert. Ähnliche Ergebnisse wurden für den

TLR7 ermittelt. Die Injektion des TLR7 Liganden Gardiquimod führte zu einer signifikanten hepatischen Immunantwort in WT und HBVtg Tieren, diese war in den HBVtg Tieren jedoch signifikant abgeschwächt, im Vergleich zu WT Tieren. Das bedeutet, die Signalkaskade wurde nicht komplett inhibiert aber manipuliert. Die hepatische Expression des TLR7 war ebenfalls nicht divergent zwischen WT und HBVtg Mäusen. Daraus ergibt sich, dass die TLR3- und TLR7-vermittelten Signalwege durch verschiedene Komponenten des Hepatitis-B-Virus beeinflusst werden. Die HBV-Polymerase ist beispielsweise dafür bekannt, die TLR3 Rezeptor Signalkaskade zu beeinflussen, wobei sowohl die NF- $\kappa$ B als auch die IRF-3 Signalgebung inhibiert ist (Wang & Ryu 2010, S.3). Des Weiteren ist gezeigt worden, dass sowohl HBV-DNA als auch das HBx-Protein mit dem *mitochondrial antiviral signaling* (MAVS) Protein interagiert, wodurch die Induktion von Ifn- $\beta$ , NF- $\kappa$ B und IRF3 gehemmt wird (Wei *et al.* 2010). Auch das HBsAg unterdrückt die Expression von IFN- $\gamma$  und ISGs in KC und LSEC, sowie die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRF-3 (Jiang *et al.* 2013). In den HBVtg Mäusen ist weder das HBxAg noch das *small* HBs in der Leber nachweisbar, aber sie exprimieren in der Leber geringe Mengen an *middle* und *large* HBs (Halverscheid *et al.* 2008). Dies zeigt, mit welchen komplexen Ausweichstrategien das Hepatitis-B-Virus versucht, die Induktion der Immunantwort zu verhindern und warum in den HBVtg Mäusen die TLR-vermittelte Signalgebung zwar reduziert, aber nicht komplett inhibiert ist.

Die TLR9 vermittelte Immunantwort, nach ODN 1826 Applikation, ist in den HBVtg Tieren zeitlich verzögert, aber nicht abweichend zu den WT. In der Literatur ist beschrieben, dass HBV einen hemmenden Einfluss auf die TLR9 Expression (Xie *et al.* 2009) und den TLR9 *downstream* Signalweg (IFN- $\alpha$  Expression) in PBMCs hat. Es wird jedoch diskutiert, ob dies HBsAg abhängig (Xu *et al.* 2009) oder unabhängig ist (Vincent *et al.* 2011). In dem hier verwendeten Mausmodell ist weder die hepatische TLR9 Expression noch die Signalweiterleitung signifikant von der in den WT Tieren zu unterscheiden. Diese Ergebnisse indizieren, dass der TLR9 ausschließlich durch das HBsAg beeinflusst würde.

Western Blot Analysen zeigten, dass die NF- $\kappa$ B Phosphorylierung (Aktivierung) in den HBVtg Tieren generell signifikant verringert war. Im Vergleich dazu ist in HBsAg positiven Patienten eine verstärkte NF- $\kappa$ B Aktivierung beobachtet worden, welche die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms begünstigt. Diese kann durch die

Behandlung mit IFN- $\gamma$  inhibiert werden (Park *et al.* 2005). Da in den HBVtg Tieren auch eine verstärkte IFN- $\gamma$  Expression determiniert wurde, erklärt dies auch die verminderte NF- $\kappa$ B Aktivierung. Aber auch die HBV-DNA, das HBx-Protein und die HBV-Polymerase können die Aktivierung von NF- $\kappa$ B blockieren (Wei *et al.* 2010; Wang & Ryu 2010).

Für verschiedene HBV-Modelle *in vitro*, wie *in vivo* ist gezeigt worden, dass TLR-Liganden die HBV-Replikation inhibieren können (Isogawa *et al.* 2005; J. Wu *et al.* 2007). Dies ist auch für das vorliegende HBVtg Mausmodell der Fall. Nach einmaliger Applikation des jeweiligen Liganden von TLR3, TLR7 oder TLR9 konnte eine signifikante HBV-Suppression ermittelt werden. Ein TLR7 Agonist wird sogar als Therapeutikum gegen HBV untersucht (Roethle *et al.* 2013; Fosdick *et al.* 2014). Da ein aktiviertes TLR-System mit IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  Expression die Virus-Replikation hemmt, ist es eine logische Konsequenz, dass das Virus Ausweichstrategien, wie beschrieben, entwickelt hat. Die immunstimulatorische siGal, welche über endosomale-MyD88-abhängige TLRs eine Immunantwort auslöst, kann auch die Replikation des Hepatitis-B-Virus hemmen. Dies scheint ein unspezifischer Effekt zu sein, welcher über die Aktivierung der TLRs vermittelt wird. Denn im Unterschied zu der spezifischen siRNA ist der Effekt von siGal nur 24h anhaltend. Während die spezifische HBx-siRNA einen suppressiven Effekt über mindestens 10 Tage induziert. Die IFN/ISG Antwort wurde jedoch nicht durch die siGal beeinflusst. Da die verwendeten siRNAs (siHBx und siHBV-Pol) alle durch eine Methylierung modifiziert sind und somit keine Immunreaktion hervorrufen (Hamm *et al.* 2010; Broering *et al.* 2013), könnte man ihre Effizienz eventuell noch steigern, indem man unmodifizierte Moleküle verwendet, welche zusätzlich zu dem spezifischen *Knockdown* noch das TLR-System stimulieren. Zu diesem Schluss kommen auch die Kollegen um Meng *et al.* (Meng *et al.* 2013), welche siRNA spezifisch gegen WHV eingesetzt haben. Ähnliche bifunktionelle Ansätze sind publiziert, in denen spezifische anti-HBV-siRNAs mit 5'Triphosphat modifiziert sind und somit zusätzlich zu ihrer spezifischen Suppressivität gegenüber HBV auch das angeborene Immunsystem über RIG-I stimulieren (Ebert *et al.* 2011; Chen *et al.* 2013).

## 4.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass siRNAs in Lebererkrankungen, wie viraler Hepatitis, therapeutische Anwendungen finden können. Entweder im direkten Einsatz gegen virale Gene, hier am Beispiel der HBV-Infektion gezeigt, oder aber im indirekten Einsatz, gegen wirtseigene Gene, welche die Virus-Replikation unterstützen (Beispiel ISG15 in der HCV-Replikation). Es müssten große Mengen siRNA intravenös z.B. über eine Infusion verabreicht werden, damit genug von der Leber resorbiert werden kann, um dort die Gen-Suppression zu vermitteln. Mit einer anderen Applikationsroute für die siRNAs, z.B. eine subkutane Therapie, könnte dieses Problem umgangen werden. Es würde auch die Anwendung für die Patienten einfacher gestalten, da die Applikation durch die Patienten selber erfolgen könnte. Da der *Isg15 Knockdown* die Antwort auf IFN- $\alpha$  *in vitro* wie *in vivo* verstärkt, wäre es des Weiteren interessant, wie sich diese Kombination auf die HCV-Replikation in humanisierten Mäusen auswirkt, auch die Kombination aus *Isg15 Knockdown* und IFN- $\lambda$  Behandlung wäre zu untersuchen. Zusätzlich könnte auch die Funktion von Hnrnp K *in vivo*, in Bezug auf die HCV-Replikation noch weiter analysiert werden.

In Folge der Proteomanalysen hat sich Psma6 als negativ Regulator der *Isg15* Expression dargestellt. Wie genau die Verbindung zwischen *Isg15* und Psma6 ist und welchen Einfluss sie auf die HCV-Replikation hat, bleibt ebenfalls weiter zu charakterisieren.

Um die Funktion des HBsAg in den HBVtg Tieren weiter untersuchen zu können, wäre eine Kreuzung aus den verwendeten Tg1,4HBV-s-mut(3) Mäusen und Mäusen notwendig, die nur transgen für das HBsAg sind. Diese würden Aufschluss darüber geben können, welchen Effekt das HBsAg auf die IFN/ISG Expression *in vivo* hat. Diese Tiere würden sich auch zur Untersuchung der HBV induzierten HCC Entstehung eignen. Des Weiteren wären die Rollen von Hnrnp K und Hmgcs1 sowie von *Isg15* in der HBV Infektion näher zu determinieren.

## 5 Zusammenfassung

Die RNAi Technologie bietet einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von hepatischen Viruserkrankungen. Um einen sicheren Einsatz von siRNAs gewährleisten zu können, ist es notwendig, die hepatischen Wirkmechanismen von siRNA zu kennen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Beteiligung von endosomalen-MyD88-abhängigen *Toll-like* Rezeptoren an der siRNA-vermittelten Immunantwort *in vivo* nachgewiesen. Diese Immunantwort wurde durch die nicht-parenchymalen Leberzellen vermittelt und resultierte in der Expression verschiedener Zytokine. Auch in weiteren Organen wie Milz, Niere und Herz war eine Immunreaktion detektierbar. Durch chemische Modifikationen am Riboserückgrat der siRNA wie 2'O-Methyl oder 2'Fluor konnte diese immunologische Nebenwirkung unterbunden werden. Des Weiteren konnte im zweiten Abschnitt mittels der Isg15-siRNA gezeigt werden, dass der Einsatz von LNP01-formulierten siRNAs im Mausmodell zu einem Hepatozyten-spezifischen *Knockdown* führte. Die verschiedenen Ribose-Modifikationen hatten hierbei keinen signifikanten Einfluss auf die Effizienz der siRNAs. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die LNP01-Formulierung auch in einem humanisierten Mausmodell zur spezifischen Gensuppression in den humanen Hepatozyten führte, sowie zur Suppression der HCV-Replikation *in vivo*. Der etablierte, siRNA-vermittelte *Knockdown* des Wirtsfaktors Isg15 *in vivo*, ist eine Option in der HCV Therapie, da er die HCV-Replikation direkt supprimiert und zusätzlich zu einer verstärkten hepatischen Reaktion auf endogenes und exogenes Interferon alpha führte. *In vitro* zeigte sich die Kombination aus siSG15 und einem Protease-Inhibitor (PI) als effiziente Therapieoption in der HCV Behandlung, mit dem Vorteil, dass die Entstehung von Resistenzen gegenüber des PIs den Therapieerfolg weniger beeinflusst. Der dritte Teil dieser Arbeit nutzte den Isg15 *Knockdown in vivo* sowie *in vitro* im HCV-Replikon Modell, um die Bedeutung von Isg15 im Rahmen der HCV-Replikation aufzuklären. Die Proteomanalyse identifizierte verschiedene Proteine, welche von der Isg15 Expression abhängig waren, welche einen direkten Effekt auf die HCV-Replikation hatten (Hnrnp K und Hmgcs1) oder in den Lipid-Metabolismus und in den Zusammenbau der Viruspartikel (*assembly*) involviert waren. Psma6 wurde als negativ Regulator der Isg15 Expression identifiziert und scheint damit indirekt die HCV-Replikation zu beeinflussen. Die Anwendung von siRNA im HBV transgenen Mausmodell im letzten Abschnitt dieser Arbeit zeigte zum einen, dass siRNAs

effiziente Werkzeuge sind, um die virale Replikation auch direkt zu hemmen. Zum anderen diente der Einsatz der siRNA der Untersuchung der HBV-induzierten Immunantwort. Es zeigte sich, dass in den HBVtg Tieren ohne HBsAg Expression eine konsistente TLR3-induzierte IFN/ISG Antwort vorlag. Auch die Expression von pro-viralen Wirtsfaktoren wie Hnnp K und Hmgcs1 war erhöht. Die Tiere wiesen ein funktionelles TLR-System auf, jedoch war die TLR3- und TLR7-abhängige Immunantwort in den Tieren reduziert, aber nicht komplett inhibiert. Diese Arbeit zeigt das Anwendungsspektrum von siRNAs *in vivo*, sie können der Untersuchung von Virus-Wirts-Interaktionen, ebenso wie der therapeutischen Anwendung gegen virale Hepatitiden, dienen.



## 6 Literaturverzeichnis

- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K. & Akira, S., 1998. Targeted Disruption of the MyD88 Gene Results in Loss of IL-1- and IL-18-Mediated Function. *Immunity*, 9(1), S.143–150.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K. & Mukherjee, S.K., 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), S.657–685.
- Ajuebor, M.N., Swain, M.G. & Perretti, M., 2002. Chemokines as novel therapeutic targets in inflammatory diseases. *Biochemical pharmacology*, 63(7), S.1191–1196.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), S.783–801.
- Akpolat, N., Yahsi, S., Godekmerdan, A., Yalniz, M. & Demirbag, K., 2005. The value of alpha-SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development: a histopathological and immunohistochemical study. *Histopathology*, 47(3), S.276–280.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. & Flavell, R.A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), S.732–738.
- Almeida, J.D., Rubenstein, D. & Stott, E.J., 1971. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet*, 2(7736), S.1225–1227.
- Ank, N., West, H., Bartholdy, C., Eriksson, K., Thomsen, A.R. & Paludan, S.R., 2006. Lambda Interferon (IFN- $\lambda$ ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs and Displays Potent Antiviral Activity against Select Virus Infections In Vivo. *Journal of Virology*, 80(9), S.4501–4509.
- Asselah, T., Bieche, I., Narguet, S., Sabbagh, A., Laurendeau, I., Ripault, M.-P., Boyer, N., Martinot-Peignoux, M., Valla, D., Vidaud, M. & Marcellin, P., 2008. Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gut*, 57(4), S.516–524.
- Bader, T. & Korba, B., 2010. Simvastatin potentiates the anti-hepatitis B virus activity of FDA-approved nucleoside analogue inhibitors in vitro. *Antiviral Research*, 86(3), S.241–245.
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V. & André, P., 2011. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in microbiology*, 19(2), S.95–103.
- Bassendine, M.F., Sheridan, D.A., Bridge, S.H., Felmlee, D.J. & Neely, R.D.G., 2013. Lipids and HCV. *Seminars in immunopathology*, 35(1), S.87–100.
- Behlke, M.A., 2006. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 13(4), S.644–670.
- Bernstein, E., Denli, A.M. & Hannon, G.J., 2001. The rest is silence. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(11), S.1509–1521.
- Bertoletti, A. & Gehring, A.J., 2006. The immune response during hepatitis B virus infection. *Journal of General Virology*, 87(6), S.1439–1449.

- Bertolino, P., McCaughan, G.W. & Bowen, D.G., 2002. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the „liver tolerance effect“. *Immunology and cell biology*, 80(1), S.84–92.
- Biermer, M., Puro, R. & Schneider, R.J., 2003. Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid Integrity through activation of NF-kappaB. *Journal of virology*, 77(7), S.4033–4042.
- Bilzer, M., Roggel, F. & Gerbes, A.L., 2006. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver International*, 26(10), S.1175–1186.
- Borkhardt, A., 2002. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference--new hope for a highly specific cancer treatment? *Cancer cell*, 2(3), S.167–168.
- Bowden, D.S., Moaven, L.D. & Locarnini, S.A., 1996. New hepatitis viruses: are there enough letters in the alphabet? *The Medical journal of Australia*, 164(2), S.87–89.
- Bradfield, J.W., 1974. Control of spillover. The importance of Kupffer-cell function in clinical medicine. *Lancet*, 2(7885), S.883–886.
- Bremer, C.M., Bung, C., Kott, N., Hardt, M. & Glebe, D., 2009. Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cellular microbiology*, 11(2), S.249–260.
- Broering, R., Lu, M. & F., J., 2011. Toll Like Receptors in Chronic Viral Hepatitis – Friend and Foe. In S. Mukomolov, hrsg. *Viral Hepatitis - Selected Issues of Pathogenesis and Diagnostics*. InTech. Available at: <http://www.intechopen.com/books/viral-hepatitis-selected-issues-of-pathogenesis-and-diagnostics/toll-like-receptors-in-chronic-viral-hepatitis-friend-and-foe> [Zugegriffen November 18, 2013].
- Broering, R., Lu, M. & Schlaak, J.F., 2011. Role of Toll-like receptors in liver health and disease. *Clinical science (London, England: 1979)*, 121(10), S.415–426.
- Broering, R., Real, C.I., John, M.J., Jahn-Hofmann, K., Ickenstein, L.M., Kleinehr, K., Paul, A., Gibbert, K., Dittmer, U., Gerken, G. & Schlaak, J.F., 2013. Chemical modifications on siRNAs avoid Toll-like-receptor-mediated activation of the hepatic immune system in vivo and in vitro. *International immunology*.
- Broering, R., Zhang, X., Kottlil, S., Trippler, M., Jiang, M., Lu, M., Gerken, G. & Schlaak, J.F., 2010. The interferon stimulated gene 15 functions as a proviral factor for the hepatitis C virus and as a regulator of the IFN response. *Gut*, 59(8), S.1111–1119.
- Brown, S.E., Howard, C.R., Zuckerman, A.J. & Steward, M.W., 1984. Affinity of antibody responses in man to hepatitis B vaccine determined with synthetic peptides. *Lancet*, 2(8396), S.184–187.
- Bruss, V. & Ganem, D., 1991. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(3), S.1059–1063.
- Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. & Morgan, R.A., 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), S.9742–9747.

- Capodici, J., Karikó, K. & Weissman, D., 2002. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(9), S.5196–5201.
- Castanotto, D. & Rossi, J.J., 2009. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*, 457(7228), S.426–433.
- Chalk, A.M., Warfinge, R.E., Georgii-Hemming, P. & Sonnhhammer, E.L.L., 2005. siRNAdb: a database of siRNA sequences. *Nucleic acids research*, 33(Database issue), S.D131–134.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Nuñez, G. & Inohara, N., 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology*, 4(7), S.702–707.
- Chayama, K., Takahashi, S., Toyota, J., Karino, Y., Ikeda, K., Ishikawa, H., Watanabe, H., McPhee, F., Hughes, E. & Kumada, H., 2012. Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b–infected null responders. *Hepatology*, 55(3), S.742–748.
- Chen, L., Borozan, I., Feld, J., Sun, J., Tannis, L.-L., Coltescu, C., Heathcote, J., Edwards, A.M. & McGilvray, I.D., 2005. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology*, 128(5), S.1437–1444.
- Chen, L., Borozan, I., Sun, J., Guindi, M., Fischer, S., Feld, J., Anand, N., Heathcote, J., Edwards, A.M. & McGilvray, I.D., 2010. Cell-type specific gene expression signature in liver underlies response to interferon therapy in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*, 138(3), S.1123–1133.e1–3.
- Chen, L., Sun, J., Meng, L., Heathcote, J., Edwards, A.M. & McGilvray, I.D., 2010. ISG15, a ubiquitin-like interferon-stimulated gene, promotes hepatitis C virus production in vitro: implications for chronic infection and response to treatment. *The Journal of general virology*, 91(Pt 2), S.382–388.
- Chen, X., Qian, Y., Yan, F., Tu, J., Yang, X., Xing, Y. & Chen, Z., 2013. 5'-triphosphate-siRNA activates RIG-I-dependent type I interferon production and enhances inhibition of hepatitis B virus replication in HepG2.2.15 cells. *European journal of pharmacology*, 721(1-3), S.86–95.
- Chen, Y.C., Delbrook, K., Dealwis, C., Mimms, L., Mushahwar, I.K. & Mandeck, W., 1996. Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(5), S.1997–2001.
- Chisari, F.V., Klopchin, K., Moriyama, T., Pasquinelli, C., Dunsford, H.A., Sell, S., Pinkert, C.A., Brinster, R.L. & Palmiter, R.D., 1989. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell*, 59(6), S.1145–1156.
- Chiu, Y.-L. & Rana, T.M., 2003. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA (New York, N. Y.)*, 9(9), S.1034–1048.

- Cho, W.G., Albuquerque, R.J.C., Kleinman, M.E., Tarallo, V., Greco, A., Nozaki, M., Green, M.G., Baffi, J.Z., Ambati, B.K., Falco, M.D., Alexander, J.S., Brunetti, A., Falco, S.D. & Ambati, J., 2009. Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), S.7137–7142.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. & Houghton, M., 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902), S.359–362.
- Choung, S., Kim, Y.J., Kim, S., Park, H.-O. & Choi, Y.-C., 2006. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochemical and biophysical research communications*, 342(3), S.919–927.
- Christen, V., Duong, F., Bernsmeier, C., Sun, D., Nassal, M. & Heim, M.H., 2007. Inhibition of Alpha Interferon Signaling by Hepatitis B Virus. *Journal of Virology*, 81(1), S.159–165.
- Chua, P.K., McCown, M.F., Rajyaguru, S., Kular, S., Varma, R., Symons, J., Chiu, S.S., Cammack, N. & Nájera, I., 2009. Modulation of alpha interferon anti-hepatitis C virus activity by ISG15. *The Journal of general virology*, 90(Pt 12), S.2929–2939.
- Chung, R.T. & Kaplan, L.M., 1999. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I (hnRNP-I/PTB) selectively binds the conserved 3' terminus of hepatitis C viral RNA. *Biochemical and biophysical research communications*, 254(2), S.351–362.
- Coburn, G.A. & Cullen, B.R., 2002. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *Journal of virology*, 76(18), S.9225–9231.
- Coller, K.E., Heaton, N.S., Berger, K.L., Cooper, J.D., Saunders, J.L. & Randall, G., 2012. Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS pathogens*, 8(1), S.e1002466.
- Dandri, M., Burda, M.R., Török, E., Pollok, J.M., Iwanska, A., Sommer, G., Rogiers, X., Rogler, C.E., Gupta, S., Will, H., Greten, H. & Petersen, J., 2001. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(4), S.981–988.
- Dao, C.T. & Zhang, D.-E., 2005. ISG15: a ubiquitin-like enigma. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 10, S.2701–2722.
- Dassie, J.P., Liu, X., Thomas, G.S., Whitaker, R.M., Thiel, K.W., Stockdale, K.R., Meyerholz, D.K., McCaffrey, A.P., McNamara, J.O. & Giangrande, P.H., 2009. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nature biotechnology*, 27(9), S.839–849.
- Delang, L., Paeshuyse, J., Vliegen, I., Leyssen, P., Obeid, S., Durantel, D., Zoulim, F., Op de Beeck, A. & Neyts, J., 2009. Statins potentiate the in vitro anti-hepatitis C virus activity of selective hepatitis C virus inhibitors and delay or prevent resistance development. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(1), S.6–16.
- Denk, H., Düllmann, J., Fischer, H.-P., Klinge, O., Lierse, W., Büschenfelde, K.-H.M. zum, Pfeifer, U., Preisegger, K.H., Ramadori, G., Tannapfel, A., Wittekind, C., Wulfhel, U. & Zhou, H., 1999. *Pathologie Der Leber und Gallenwege*, Springer DE.

- Dickensheets, H., Sheikh, F., Park, O., Gao, B. & Donnelly, R.P., 2012. Interferon-lambda (IFN- $\lambda$ ) induces signal transduction and gene expression in human hepatocytes but not in lymphocytes or monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. Available at: <http://www.jleukbio.org/content/early/2012/12/19/jlb.0812395> [Zugegriffen April 4, 2013].
- Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L. & Knolle, P.A., 2008. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8<sup>+</sup> T cell tolerance. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(1), S.296–305.
- Dill, M.T., Duong, F.H.T., Vogt, J.E., Bibert, S., Bochud, P., Terracciano, L., Papassotiropoulos, A., Roth, V. & Heim, M.H., 2011. Interferon-Induced Gene Expression Is a Stronger Predictor of Treatment Response Than IL28B Genotype in Patients With Hepatitis C. *Gastroenterology*, 140(3), S.1021–1031.e10.
- Dorner, M., Horwitz, J.A., Donovan, B.M., Labitt, R.N., Budell, W.C., Friling, T., Vogt, A., Catanese, M.T., Satoh, T., Kawai, T., Akira, S., Law, M., Rice, C.M. & Ploss, A., 2013. Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature*, 501(7466), S.237–241.
- Dorner, M., Horwitz, J.A., Robbins, J.B., Barry, W.T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C.T., Schoggins, J.W., Catanese, M.T., Burton, D.R., Law, M., Rice, C.M. & Ploss, A., 2011. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature*, 474(7350), S.208–211.
- Dorner, M., Rice, C.M. & Ploss, A., 2012. Study of hepatitis C virus entry in genetically humanized mice. *Methods (San Diego, Calif.)*.
- Duex, J.E., Comeau, L., Sorkin, A., Purow, B. & Kefas, B., 2011. Usp18 regulates epidermal growth factor (EGF) receptor expression and cancer cell survival via microRNA-7. *The Journal of biological chemistry*, 286(28), S.25377–25386.
- Dunn, C., Peppas, D., Khanna, P., Nebbia, G., Jones, M., Brendish, N., Lascar, R.M., Brown, D., Gilson, R.J., Tedder, R.J., Dusheiko, G.M., Jacobs, M., Klenerman, P. & Maini, M.K., 2009. Temporal Analysis of Early Immune Responses in Patients With Acute Hepatitis B Virus Infection. *Gastroenterology*, 137(4), S.1289–1300.
- Ebert, G., Poeck, H., Lucifora, J., Baschuk, N., Esser, K., Esposito, I., Hartmann, G. & Protzer, U., 2011. 5' Triphosphorylated small interfering RNAs control replication of hepatitis B virus and induce an interferon response in human liver cells and mice. *Gastroenterology*, 141(2), S.696–706, 706.e1–3.
- Eggert, C. & Fischer, U., 2003. RNA-Interferenz: Ein neues Werkzeug zur Analyse der Genfunktion. , *BIOspektrum*(9. Jahrgang), S.372–374.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), S.494–498.
- Elenich, L.A., Nandi, D., Kent, A.E., McCluskey, T.S., Cruz, M., Iyer, M.N., Woodward, E.C., Conn, C.W., Ochoa, A.L., Ginsburg, D.B. & Monaco, J.J., 1999. The complete primary structure of mouse 20S proteasomes. *Immunogenetics*, 49(10), S.835–842.
- Farrell, P.J., Broeze, R.J. & Lengyel, P., 1979. Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature*, 279(5713), S.523–525.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), S.806–811.
- Fosdick, A., Zheng, J., Pflanz, S., Frey, C.R., Hesselgesser, J., Halcomb, R.L., Wolfgang, G. & Tumas, D.B., 2014. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of GS-9620, a novel Toll-like receptor 7 agonist, demonstrate interferon-stimulated gene induction without detectable serum interferon at low oral doses. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 348(1), S.96–105.
- Foster, G.R., Hézode, C., Bronowicki, J., Carosi, G., Weiland, O., Verlinden, L., van Heeswijk, R., van Baelen, B., Picchio, G. & Beumont, M., 2011. Telaprevir Alone or With Peginterferon and Ribavirin Reduces HCV RNA in Patients With Chronic Genotype 2 but Not Genotype 3 Infections. *Gastroenterology*, 141(3), S.881–889.e1.
- Frank-Kamenetsky, M., Grefhorst, A., Anderson, N.N., Racie, T.S., Bramlage, B., Akinc, A., Butler, D., Charisse, K., Dorkin, R., Fan, Y., Gamba-Vitalo, C., Hadwiger, P., Jayaraman, M., John, M., Jayaprakash, K.N., Maier, M., Nechev, L., Rajeev, K.G., Read, T., Röhl, I., Soutschek, J., Tan, P., Wong, J., Wang, G., Zimmermann, T., de Fougerolles, A., Vornlocher, H.-P., Langer, R., Anderson, D.G., Manoharan, M., Kotliansky, V., Horton, J.D. & Fitzgerald, K., 2008. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), S.11915–11920.
- Fraser, R., Dobbs, B.R. & Rogers, G.W., 1995. Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 21(3), S.863–874.
- Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Gonçalves, F.L., Jr, Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J. & Yu, J., 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*, 347(13), S.975–982.
- Friedman, S.L., 2008. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*, 134(6), S.1655–1669.
- Fukushi, S., Okada, M., Kageyama, T., Hoshino, F.B., Nagai, K. & Katayama, K., 2001. Interaction of poly(rC)-binding protein 2 with the 5'-terminal stem loop of the hepatitis C-virus genome. *Virus research*, 73(1), S.67–79.
- Gane, E.J., Stedman, C.A., Hyland, R.H., Ding, X., Svarovskaia, E., Symonds, W.T., Hinds, R.G. & Berrey, M.M., 2013. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *The New England journal of medicine*, 368(1), S.34–44.
- Gangur, V., Birmingham, N.P. & Thanesvorakul, S., 2002. Chemokines in health and disease. *Veterinary immunology and immunopathology*, 86(3-4), S.127–136.
- Garcia-Sastre, A. & Biron, C.A., 2006. Type 1 Interferons and the Virus-Host Relationship: A Lesson in Detente. *Science*, 312(5775), S.879–882.
- Gavrilov, K. & Saltzman, W.M., 2012. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *The Yale journal of biology and medicine*, 85(2), S.187–200.
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., Sulkowski, M., McHutchison, J.G. & Goldstein,

- D.B., 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461(7262), S.399–401.
- Gemsa, D., Kalden, J.R. & Resch, K., 1997. *Immunologie* 4. Auflage., Stuttgart: Thieme Verlag.
- Gerold, G., Rice, C.M. & Ploss, A., 2010. Teaching New Tricks to an Old Foe: Murinizing Hepatitis C Virus. *Hepatology*, 52(6), S.2233–2236.
- Girones, R. & Miller, R.H., 1989. Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology*, 170(2), S.595–597.
- Gontarek, R.R., Gutshall, L.L., Herold, K.M., Tsai, J., Sathe, G.M., Mao, J., Prescott, C. & Del Vecchio, A.M., 1999. hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3'NTR of the HCV RNA genome. *Nucleic acids research*, 27(6), S.1457–1463.
- Habersetzer, F., Leboeuf, C., Doffoël, M. & Baumert, T.F., 2012. Boceprevir and personalized medicine in hepatitis C virus infection. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 5, S.125–137.
- Hafenrichter, D.G., Roland, C.R., Mangino, M.J. & Flye, M.W., 1994. The Kupffer cell in endotoxin tolerance: mechanisms of protection against lethal endotoxemia. *Shock (Augusta, Ga.)*, 2(4), S.251–256.
- Haller, O., Staeheli, P. & Kochs, G., 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*, 89(6–7), S.812–818.
- Halverscheid, L., Mannes, N.K., Weth, R., Kleinschmidt, M., Schultz, U., Reifenberg, K., Schirmbeck, R., Nassal, M., Blum, H.E., Reimann, J. & Geissler, M., 2008. Transgenic mice replicating hepatitis B virus but lacking expression of the major HBsAg. *Journal of medical virology*, 80(4), S.583–590.
- Hamm, S., Latz, E., Hangel, D., Müller, T., Yu, P., Golenbock, D., Sparwasser, T., Wagner, H. & Bauer, S., 2010. Alternating 2'-O-ribose methylation is a universal approach for generating non-stimulatory siRNA by acting as TLR7 antagonist. *Immunobiology*, 215(7), S.559–569.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775), S.293–296.
- Harder, R., Uhlig, H., Kashan, A., Schütt, B., Duijvestijn, A., Butcher, E.C., Thiele, H.G. & Hamann, A., 1991. Dissection of murine lymphocyte-endothelial cell interaction mechanisms by SV-40-transformed mouse endothelial cell lines: novel mechanisms mediating basal binding, and alpha 4-integrin-dependent cytokine-induced adhesion. *Experimental cell research*, 197(2), S.259–267.
- He, X., Jia, H., Jing, Z. & Liu, D., 2013. Recognition of pathogen-associated nucleic acids by endosomal nucleic acid-sensing toll-like receptors. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 45(4), S.241–258.
- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H. & Gerlich, W.H., 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *Journal of virology*, 52(2), S.396–402.

- Heidrich, B., Manns, M.P. & Wedemeyer, H., 2013. Treatment options for hepatitis delta virus infection. *Current infectious disease reports*, 15(1), S.31–38.
- Heim, M.H., 2012. Interferons and hepatitis C virus. *Swiss medical weekly*, 142, S.w13586.
- Hidmark, A., von Saint Paul, A. & Dalpke, A.H., 2012. Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(6), S.2717–2721.
- Hohne, M., Schaefer, S., Seifer, M., Feitelson, M.A., Paul, D. & Gerlich, W.H., 1990. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *The EMBO Journal*, 9(4), S.1137–1145.
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S. & Hartmann, G., 2005. Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature Medicine*, 11(3), S.263–270.
- Hösel, M., Quasdorff, M., Wiegmann, K., Webb, D., Zedler, U., Broxtermann, M., Tedjokusumo, R., Esser, K., Arzberger, S., Kirschning, C.J., Langenkamp, A., Falk, C., Büning, H., Rose-John, S. & Protzer, U., 2009. Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 50(6), S.1773–1782.
- Hruska, J.F., Clayton, D.A., Rubenstein, J.L. & Robinson, W.S., 1977. Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *Journal of Virology*, 21(2), S.666–672.
- Hsieh, T.-Y., Matsumoto, M., Chou, H.-C., Schneider, R., Hwang, S.B., Lee, A.S. & Lai, M.M.C., 1998. Hepatitis C Virus Core Protein Interacts with Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K. *Journal of Biological Chemistry*, 273(28), S.17651–17659.
- Huang, Y.-W., Lin, S.-C., Wei, S.-C., Hu, J.-T., Chang, H.-Y., Huang, S.-H., Chen, D.-S., Chen, P.-J., Hsu, P.-N., Yang, S.-S. & Kao, J.-H., 2013. Reduced Toll-like receptor 3 expression in chronic hepatitis B patients and its restoration by interferon therapy. *Antiviral therapy*, 18(7), S.877–884.
- Hwang, B., Lim, J.H., Hahm, B., Jang, S.K. & Lee, S.-W., 2009. hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES. *Biochemical and biophysical research communications*, 378(3), S.584–588.
- Isaacs, A. & Lindenmann, J., 1987. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *Journal of interferon research*, 7(5), S.429–438.
- Isogawa, M., Robek, M.D., Furuichi, Y. & Chisari, F.V., 2005. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *Journal of virology*, 79(11), S.7269–7272.
- Jackson, A.L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., Johnson, J.M., Lim, L., Karpilow, J., Nichols, K., Marshall, W., Khvorova, A. & Linsley, P.S., 2006. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces „off-target“ transcript silencing. *RNA*, 12(7), S.1197–1205.
- Jacobson, I.M., McHutchison, J.G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A.M., Reddy, K.R., Bzowej, N.H., Marcellin, P., Muir, A.J., Ferenci, P., Flisiak, R., George, J., Rizzetto, M., Shouval, D., Sola, R., Terg, R.A., Yoshida, E.M., Adda, N., Bengtsson, L., Sankoh, A.J., Kieffer, T.L., George, S., Kauffman, R.S. & Zeuzem, S., 2011. Telaprevir for



- previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*, 364(25), S.2405–2416.
- Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patack, A.K., Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, B.D., Kauppinen, S., Levin, A.A. & Hodges, M.R., 2013. Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *The New England journal of medicine*.
- Jessop, C.E., Watkins, R.H., Simmons, J.J., Tasab, M. & Bulleid, N.J., 2009. Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins. *Journal of cell science*, 122(Pt 23), S.4287–4295.
- Jiang, M., Broering, R., Trippler, M., Poggenpohl, L., Fiedler, M., Gerken, G., Lu, M. & Schlaak, J.F., 2013. Toll-like receptor-mediated immune responses are attenuated in the presence of high levels of hepatitis B virus surface antigen.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M. & Sarnow, P., 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5740), S.1577–1581.
- Judge, A. & MacLachlan, I., 2008. Overcoming the Innate Immune Response to Small Interfering RNA. *Human Gene Therapy*, 19(2), S.111–124.
- Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K. & MacLachlan, I., 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature Biotechnology*, 23(4), S.457–462.
- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H. & Weissman, D., 2005. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 23(2), S.165–175.
- Kawai, T. & Akira, S., 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nature immunology*, 7(2), S.131–137.
- Kawai, T. & Akira, S., 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), S.637–650.
- Keaney, J., Campbell, M. & Humphries, P., 2011. From RNA interference technology to effective therapy: how far have we come and how far to go? *Therapeutic delivery*, 2(11), S.1395–1406.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. & Plasterk, R.H., 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development*, 15(20), S.2654–2659.
- Kim, C.S., Seol, S.K., Song, O.-K., Park, J.H. & Jang, S.K., 2007. An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *Journal of virology*, 81(8), S.3852–3865.
- Kim, K., Kim, K.H., Kim, H.H. & Cheong, J., 2008. Hepatitis B virus X protein induces lipogenic transcription factor SREBP1 and fatty acid synthase through the activation of nuclear receptor LXRalpha. *The Biochemical journal*, 416(2), S.219–230.
- Kim, K.I., Giannakopoulos, N.V., Virgin, H.W. & Zhang, D.-E., 2004. Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation. *Molecular and cellular biology*, 24(21), S.9592–9600.

- Kleinman, M.E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J.Z., Albuquerque, R.J.C., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y., Appukuttan, B., Gibbs, D., Yang, Z., Kariko, K., Ambati, B.K., Wilgus, T.A., DiPietro, L.A., Sakurai, E., Zhang, K., Smith, J.R., Taylor, E.W. & Ambati, J., 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*, 452(7187), S.591–597.
- Knolle, P.A. & Gerken, 2000. Local control of the immune response in the liver. *Immunological reviews*, 174, S.21–34.
- Koutsoudakis, G., Forns, X. & Pérez-Del-Pulgar, S., 2013. [The molecular biology of hepatitis C virus.]. *Gastroenterologia y hepatologia*.
- Krecic, A.M. & Swanson, M.S., 1999. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Current opinion in cell biology*, 11(3), S.363–371.
- Lan, T. & Kandimalla, E.R., 2011. Synthesis, purification, and characterization of oligoribonucleotides that act as agonists of TLR7 and/or TLR8. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 764, S.249–261.
- Landers, T.A., Greenberg, H.B. & Robinson, W.S., 1977. Structure of Hepatitis B Dane Particle DNA and Nature of the Endogenous DNA Polymerase Reaction. *Journal of Virology*, 23(2), S.368–376.
- Lanford, R.E., Guerra, B., Bigger, C.B., Lee, H., Chavez, D. & Brasky, K.M., 2007. Lack of response to exogenous interferon- $\alpha$  in the liver of chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *Hepatology*, 46(4), S.999–1008.
- Lenschow, D.J., 2010. Antiviral Properties of ISG15. *Viruses*, 2(10), S.2154–2168.
- Lenschow, D.J., Giannakopoulos, N.V., Gunn, L.J., Johnston, C., O'Guin, A.K., Schmidt, R.E., Levine, B. & Virgin, H.W., 4th, 2005. Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. *Journal of virology*, 79(22), S.13974–13983.
- Lenschow, D.J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N.V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R.E., García-Sastre, A., Leib, D.A., Pekosz, A., Knobeloch, K.-P., Horak, I. & Virgin, H.W., 4th, 2007. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), S.1371–1376.
- Li, N., Li, Q., Qian, Z., Zhang, Y., Chen, M. & Shi, G., 2009. Impaired TLR3/IFN-beta signaling in monocyte-derived dendritic cells from patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure: relevance to the severity of liver damage. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(3), S.630–635.
- Li, Y., Berke, I.C. & Modis, Y., 2012. DNA binding to proteolytically activated TLR9 is sequence-independent and enhanced by DNA curvature. *The EMBO journal*, 31(4), S.919–931.
- Liang, T.J., 2009. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(5 Suppl), S.S13–21.
- Lin, C., Lin, K., Luong, Y.-P., Rao, B.G., Wei, Y.-Y., Brennan, D.L., Fulghum, J.R., Hsiao, H.-M., Ma, S., Maxwell, J.P., Cottrell, K.M., Perni, R.B., Gates, C.A. & Kwong, A.D., 2004. In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950

- and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 279(17), S.17508–17514.
- Lin, C.-Y., Chen, J.-Y., Lin, T.-N., Jeng, W.-J., Huang, C.-H., Huang, C.-W., Chang, S.-W. & Sheen, I.-S., 2011. IL28B SNP rs12979860 is a critical predictor for on-treatment and sustained virologic response in patients with hepatitis C virus genotype-1 infection. *PloS one*, 6(3), S.e18322.
- Lippert, H., 2003. *Lehrbuch Anatomie* 6. Auflage., München: Urban & Fischer Verlag.
- Lohmann, V., 2013. Hepatitis C virus RNA replication. *Current topics in microbiology and immunology*, 369, S.167–198.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R., 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5424), S.110–113.
- Love, K.T., Mahon, K.P., Levins, C.G., Whitehead, K.A., Querbes, W., Dorkin, J.R., Qin, J., Cantley, W., Qin, L.L., Racie, T., Frank-Kamenetsky, M., Yip, K.N., Alvarez, R., Sah, D.W.Y., Fougerolles, A. de, Fitzgerald, K., Kotliansky, V., Akinc, A., Langer, R. & Anderson, D.G., 2010. Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), S.1864–1869.
- Makowska, Z., Duong, F.H.T., Trincucci, G., Tough, D.F. & Heim, M.H., 2011. Interferon- $\beta$  and interferon- $\lambda$  signaling is not affected by interferon-induced refractoriness to interferon- $\alpha$  in vivo. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(4), S.1154–1163.
- Mannová, P., Fang, R., Wang, H., Deng, B., McIntosh, M.W., Hanash, S.M. & Beretta, L., 2006. Modification of Host Lipid Raft Proteome upon Hepatitis C Virus Replication. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(12), S.2319–2325.
- Manoharan, M., Akinc, A., Pandey, R.K., Qin, J., Hadwiger, P., John, M., Mills, K., Charisse, K., Maier, M.A., Nechev, L., Greene, E.M., Pallan, P.S., Rozners, E., Rajeev, K.G. & Egli, M., 2011. Unique Gene-silencing and Structural Properties of 2'-F Modified siRNAs. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(10), S.2284–2288.
- Mariño, Z., van Bömmel, F., Forns, X. & Berg, T., 2014. New concepts of sofosbuvir-based treatment regimens in patients with hepatitis C. *Gut*, 63(2), S.207–215.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Elbashir, S.M., Harborth, J., Hossbach, M., Urlaub, H., Meyer, J., Weber, K., Vandenburgh, K., Manninga, H., Scaringe, S.A., Luehrmann, R. & Tuschl, T., 2003. Analysis of mammalian gene function using small interfering RNAs. *Nucleic acids research. Supplement (2001)*, (3), S.333.
- McCaffrey, A.P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F.H., Xu, H., Wieland, S.F., Marion, P.L. & Kay, M.A., 2003. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nature biotechnology*, 21(6), S.639–644.
- McCaffrey, A.P., Ohashi, K., Meuse, L., Shen, S., Lancaster, A.M., Lukavsky, P.J., Sarnow, P. & Kay, M.A., 2002. Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 5(6), S.676–684.
- McHutchison, J.G. & Fried, M.W., 2003. Current therapy for hepatitis C: pegylated interferon and ribavirin. *Clinics in Liver Disease*, 7(1), S.149–161.

- McManus, M.T. & Sharp, P.A., 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Reviews Genetics*, 3(10), S.737–747.
- McOmish, F., Yap, P.L., Dow, B.C., Follett, E.A., Seed, C., Keller, A.J., Cobain, T.J., Krusius, T., Kolho, E. & Naukkarinen, R., 1994. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *Journal of clinical microbiology*, 32(4), S.884–892.
- McWilliam Leitch, E.C. & McLauchlan, J., 2013. Determining the cellular diversity of hepatitis C virus quasispecies by single-cell viral sequencing. *Journal of virology*, 87(23), S.12648–12655.
- Megger, D.A., Bracht, T., Kohl, M., Ahrens, M., Naboulsi, W., Weber, F., Hoffmann, A.-C., Stephan, C., Kuhlmann, K., Eisenacher, M., Schlaak, J.F., Baba, H.A., Meyer, H.E. & Sitek, B., 2013. Proteomic differences between hepatocellular carcinoma and non-tumorous liver tissue investigated by a combined 2D-DIGE and label-free quantitative proteomics study. *Molecular & cellular proteomics: MCP*.
- Melian, E.B. & Plosker, G.L., 2001. Interferon alfacon-1: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of chronic hepatitis C. *Drugs*, 61(11), S.1661–1691.
- Meng, Z., Ma, Z., Zhang, E., Kosinska, A.D., Liu, J., Zhang, X., Zhou, T., Wu, J., Dahmen, U., Dirsch, O., Yang, D., Roggendorf, M. & Lu, M., 2014. Novel Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) Transgene Mouse Models Show Sex-Dependent WHV Replicative Activity and Development of Spontaneous Immune Responses to WHV Proteins. *Journal of virology*, 88(3), S.1573–1581.
- Meng, Z., Qiu, S., Zhang, X., Wu, J., Schreiter, T., Xu, Y., Yang, D., Roggendorf, M., Schlaak, J. & Lu, M., 2009. Inhibition of woodchuck hepatitis virus gene expression in primary hepatocytes by siRNA enhances the cellular gene expression. *Virology*, 384(1), S.88–96.
- Meng, Z., Zhang, X., Wu, J., Pei, R., Xu, Y., Yang, D., Roggendorf, M. & Lu, M., 2013. RNAi Induces Innate Immunity through Multiple Cellular Signaling Pathways. *PLoS ONE*, 8(5). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3659100/> [Zugegriffen Januar 21, 2014].
- Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., Tyrrell, D.L. & Kneteman, N.M., 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature medicine*, 7(8), S.927–933.
- Miller, R.H., Marion, P.L. & Robinson, W.S., 1984. Hepatitis B viral DNA-RNA hybrid molecules in particles from infected liver are converted to viral DNA molecules during an endogenous dna polymerase reaction. *Virology*, 139(1), S.64–72.
- Miyazaki, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. & Shimotohno, K., 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature cell biology*, 9(9), S.1089–1097.
- Moradpour, D. & Penin, F., 2013. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Current topics in microbiology and immunology*, 369, S.113–142.
- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C.M., 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews. Microbiology*, 5(6), S.453–463.

- Murray, E.J., Burden, F., Horscroft, N., Smith-Burchnell, C. & Westby, M., 2011. Knockdown of USP18 Increases Alpha 2a Interferon Signaling and Induction of Interferon-Stimulating Genes but Does Not Increase Antiviral Activity in Huh7 Cells<sup>▽</sup>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), S.4311–4319.
- Nakamuta, M., Yada, R., Fujino, T., Yada, M., Higuchi, N., Tanaka, M., Miyazaki, M., Kohjima, M., Kato, M., Yoshimoto, T., Harada, N., Taketomi, A., Maehara, Y., Koga, M., Nishinakagawa, T., Nakashima, M., Kotoh, K. & Enjoji, M., 2009. Changes in the expression of cholesterol metabolism-associated genes in HCV-infected liver: a novel target for therapy? *International journal of molecular medicine*, 24(6), S.825–828.
- Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell*, 2(4), S.279–289.
- Nelson, D.R., 2009. Hepatitis C drug development at a crossroads. *Hepatology*, 50(4), S.997–999.
- Ng, L.F.P., Chan, M., Chan, S.-H., Cheng, P.C.-P., Leung, E.H.-C., Chen, W.-N. & Ren, E.-C., 2005. Host heterogeneous ribonucleoprotein K (hnRNP K) as a potential target to suppress hepatitis B virus replication. *PLoS medicine*, 2(7), S.e163.
- Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J., 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108(2), S.193–199.
- Olmstead, A.D., Knecht, W., Lazarov, I., Dixit, S.B. & Jean, F., 2012. Human subtilase SKI-1/S1P is a master regulator of the HCV Lifecycle and a potential host cell target for developing indirect-acting antiviral agents. *PLoS pathogens*, 8(1), S.e1002468.
- Osiak, A., Utermöhlen, O., Niendorf, S., Horak, I. & Knobeloch, K.-P., 2005. ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus. *Molecular and cellular biology*, 25(15), S.6338–6345.
- Paek, K.Y., Kim, C.S., Park, S.M., Kim, J.H. & Jang, S.K., 2008. RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA. *Journal of virology*, 82(24), S.12082–12093.
- Papadopoulou, C., Boukakis, G., Ganou, V., Patrino-Georgoula, M. & Guialis, A., 2012. Expression profile and interactions of hnRNP A3 within hnRNP/mRNP complexes in mammals. *Archives of biochemistry and biophysics*, 523(2), S.151–160.
- Park, S.G., Ryu, H.M., Lim, S.-O., Kim, Y.-I., Hwang, S.B. & Jung, G., 2005. Interferon- $\gamma$  Inhibits Hepatitis B Virus-Induced NF- $\kappa$ B Activation Through Nuclear Localization of NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase. *Gastroenterology*, 128(7), S.2042–2053.
- Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.-Y., Trassard, S., Sureau, C. & Roingeard, P., 2007. Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking. *Journal of Virology*, 81(8), S.3842–3851.
- Pawłowska, M., 2011. [Attempts to treat chronic hepatitis C with HCV protease inhibitor]. *Przegląd epidemiologiczny*, 65(1), S.35–38.
- Peng, L.F., Schaefer, E.A.K., Maloof, N., Skaff, A., Berical, A., Belon, C.A., Heck, J.A., Lin, W., Frick, D.N., Allen, T.M., Miziorko, H.M., Schreiber, S.L. & Chung, R.T., 2011. Ceestatin, a novel small molecule inhibitor of hepatitis C virus replication, inhibits 3-

- hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. *The Journal of infectious diseases*, 204(4), S.609–616.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. & Cottrell, J.S., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18), S.3551–3567.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N. & Filipowicz, W., 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in cell biology*, 17(3), S.118–126.
- Plasterk, R.H.A., 2002. RNA silencing: the genome's immune system. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5571), S.1263–1265.
- Ploss, A. & Rice, C.M., 2009. Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO reports*, 10(11), S.1220–1227.
- Pollock, S., Nichita, N.B., Böhmer, A., Radulescu, C., Dwek, R.A. & Zitzmann, N., 2010. Polyunsaturated liposomes are antiviral against hepatitis B and C viruses and HIV by decreasing cholesterol levels in infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), S.17176–17181.
- Poordad, F., Lawitz, E., Kowdley, K.V., Cohen, D.E., Podsadecki, T., Siggelkow, S., Heckaman, M., Larsen, L., Menon, R., Koev, G., Tripathi, R., Pilot-Matias, T. & Bernstein, B., 2013. Exploratory study of oral combination antiviral therapy for hepatitis C. *The New England journal of medicine*, 368(1), S.45–53.
- Poschmann, G., Sitek, B., Sipos, B., Ulrich, A., Wiese, S., Stephan, C., Warscheid, B., Klöppel, G., Vander Borgh, A., Ramaekers, F.C.S., Meyer, H.E. & Stühler, K., 2009. Identification of proteomic differences between squamous cell carcinoma of the lung and bronchial epithelium. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 8(5), S.1105–1116.
- Puro, R. & Schneider, R.J., 2007. Tumor necrosis factor activates a conserved innate antiviral response to hepatitis B virus that destabilizes nucleocapsids and reduces nuclear viral DNA. *Journal of virology*, 81(14), S.7351–7362.
- Ramachandran, P., Fraser, A., Agarwal, K., Austin, A., Brown, A., Foster, G.R., Fox, R., Hayes, P.C., Leen, C., Mills, P.R., Mutimer, D.J., Ryder, S.D. & Dillon, J.F., 2012. UK consensus guidelines for the use of the protease inhibitors boceprevir and telaprevir in genotype 1 chronic hepatitis C infected patients. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 35(6), S.647–662.
- Ramírez-Torres, A., Barceló-Batllo, S., Martínez-Beamonte, R., Navarro, M.A., Surra, J.C., Arnal, C., Guillén, N., Acín, S. & Osada, J., 2012. Proteomics and gene expression analyses of squalene-supplemented mice identify microsomal thioredoxin domain-containing protein 5 changes associated with hepatic steatosis. *Journal of proteomics*, 77, S.27–39.
- Randall, G., Chen, L., Panis, M., Fischer, A.K., Lindenbach, B.D., Sun, J., Heathcote, J., Rice, C.M., Edwards, A.M. & McGilvray, I.D., 2006. Silencing of USP18 potentiates the antiviral activity of interferon against hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 131(5), S.1584–1591.
- Real, C.I., Megger, D.A., Sitek, B., Jahn-Hofmann, K., Ickenstein, L.M., John, M.J., Walker, A., Timm, J., Kuhlmann, K., Eisenacher, M., Meyer, H.E., Gerken, G., Broering, R. & Schlaak, J.F., 2013. Identification of proteins that mediate the pro-viral functions of

- the interferon stimulated gene 15 in hepatitis C virus replication. *Antiviral Research*, 100(3), S.654–661.
- Reifenberg, K., Hildt, E., Lecher, B., Wiese, E., Nusser, P., Ott, S., Yamamura, K.-I., Rutter, G. & Löhler, J., 2006. IFN $\gamma$  expression inhibits LHBs storage disease and ground glass hepatocyte appearance, but exacerbates inflammation and apoptosis in HBV surface protein-accumulating transgenic livers. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 26(8), S.986–993.
- Ren, G.-L., Huang, G.-Y., Zheng, H., Fang, Y., Ma, H.-H., Xu, M.-C., Zhang, H.-B., Zhang, W.-Y., Zhao, Y.-G., Sun, D.-Y., Hu, W.-K. & Liu, J., 2013. Changes in Innate and Permissive Immune Responses after HBV Transgenic Mouse Vaccination and ILong-Term-siRNA Treatment. *PLoS ONE*, 8(3). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3589400/> [Zugegriffen November 12, 2013].
- Ribeiro, R.M., Li, H., Wang, S., Stoddard, M.B., Learn, G.H., Korber, B.T., Bhattacharya, T., Guedj, J., Parrish, E.H., Hahn, B.H., Shaw, G.M. & Perelson, A.S., 2012. Quantifying the diversification of hepatitis C virus (HCV) during primary infection: estimates of the in vivo mutation rate. *PLoS pathogens*, 8(8), S.e1002881.
- Robek, M.D., Boyd, B.S. & Chisari, F.V., 2005. Lambda Interferon Inhibits Hepatitis B and C Virus Replication. *Journal of Virology*, 79(6), S.3851–3854.
- Robinson, W.S., Clayton, D.A. & Greenman, R.L., 1974. DNA of a Human Hepatitis B Virus Candidate. *Journal of Virology*, 14(2), S.384–391.
- Roethle, P.A., McFadden, R.M., Yang, H., Hrvatin, P., Hui, H., Graupe, M., Gallagher, B., Chao, J., Hesselgesser, J., Duatschek, P., Zheng, J., Lu, B., Tumas, D.B., Perry, J. & Halcomb, R.L., 2013. Identification and optimization of pteridinone Toll-like receptor 7 (TLR7) agonists for the oral treatment of viral hepatitis. *Journal of medicinal chemistry*, 56(18), S.7324–7333.
- Romano, N. & Macino, G., 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology*, 6(22), S.3343–3353.
- Sadler, A.J. & Williams, B.R.G., 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology*, 8(7), S.559–568.
- Samuel, C.E., 2001. Antiviral Actions of Interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), S.778–809.
- Sarasin-Filipowicz, M., Oakeley, E.J., Duong, F.H.T., Christen, V., Terracciano, L., Filipowicz, W. & Heim, M.H., 2008. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(19), S.7034–7039.
- Schirmbeck, R., Zheng, X., Roggendorf, M., Geissler, M., Chisari, F.V., Reimann, J. & Lu, M., 2001. Targeting murine immune responses to selected T cell- or antibody-defined determinants of the hepatitis B surface antigen by plasmid DNA vaccines encoding chimeric antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(2), S.1405–1413.
- Schlaak, J.F., Trippler, M., Hoyo-Becerra, C., Erim, Y., Kis, B., Wang, B., Scherbaum, N. & Gerken, G., 2012. Selective Hyper-responsiveness of the Interferon System in Major

- Depressive Disorders and Depression Induced by Interferon Therapy. *PLoS ONE*, 7(6), S.e38668.
- Schrage, A., Loddenkemper, C., Erben, U., Lauer, U., Hausdorf, G., Jungblut, P.R., Johnson, J., Knolle, P.A., Zeitz, M., Hamann, A. & Klugewitz, K., 2008. Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(4), S.441–451.
- Schultz, U. & Chisari, F.V., 1999. Recombinant Duck Interferon Gamma Inhibits Duck Hepatitis B Virus Replication in Primary Hepatocytes. *Journal of Virology*, 73(4), S.3162–3168.
- Seeger, C. & Mason, W.S., 2000. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), S.51–68.
- Seta, T., Yokosuka, O., Imazeki, F., Tagawa, M. & Saisho, H., 2000. Emergence of YMDD motif mutants of hepatitis B virus during lamivudine treatment of immunocompetent type B hepatitis patients. *Journal of medical virology*, 60(1), S.8–16.
- Shechter, I., Dai, P., Huo, L. & Guan, G., 2003. IDH1 gene transcription is sterol regulated and activated by SREBP-1a and SREBP-2 in human hepatoma HepG2 cells evidence that IDH1 may regulate lipogenesis in hepatic cells. *Journal of Lipid Research*, 44(11), S.2169–2180.
- Shen, H., Zhang, M., Minuk, G.Y. & Gong, Y., 2002. Different effects of rat interferon alpha, beta and gamma on rat hepatic stellate cell proliferation and activation. *BMC Cell Biology*, 3(1), S.9.
- Sheridan, D.A., Bridge, S.H., Felmlee, D.J., Crossey, M.M.E., Thomas, H.C., Taylor-Robinson, S.D., Toms, G.L., Neely, R.D.G. & Bassendine, M.F., 2012. Apolipoprotein-E and hepatitis C lipoviral particles in genotype 1 infection: evidence for an association with interferon sensitivity. *Journal of hepatology*, 57(1), S.32–38.
- Shi, Z., Cai, Z., Sanchez, A., Zhang, T., Wen, S., Wang, J., Yang, J., Fu, S. & Zhang, D., 2011. A Novel Toll-like Receptor That Recognizes Vesicular Stomatitis Virus. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(6), S.4517–4524.
- Shlomai, A. & Shaul, Y., 2003. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 37(4), S.764–770.
- Silva, J.M., Hammond, S.M. & Hannon, G.J., 2002. RNA interference: a promising approach to antiviral therapy? *Trends in molecular medicine*, 8(11), S.505–508.
- Silverman, R.H., 2007. Viral Encounters with 2',5'-Oligoadenylate Synthetase and RNase L during the Interferon Antiviral Response. *Journal of Virology*, 81(23), S.12720–12729.
- Sioud, M., 2005. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *Journal of molecular biology*, 348(5), S.1079–1090.
- Smith, D.B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A.S., Rice, C.M., Stapleton, J.T. & Simmonds, P., 2013. Expanded classification of hepatitis C Virus into 7 genotypes and 67 Subtypes: updated criteria and assignment web resource. *Hepatology (Baltimore, Md.)*.



- Soni, P.N., Brown, D., Saffie, R., Savage, K., Moore, D., Gregoriadis, G. & Dusheiko, G.M., 1998. Biodistribution, stability, and antiviral efficacy of liposome-entrapped phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides in ducks for the treatment of chronic duck hepatitis B virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 28(5), S.1402–1410.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Röhl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Kotliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M. & Vornlocher, H.-P., 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432(7014), S.173–178.
- Sulkowski, M.S., Cooper, C., Hunyady, B., Jia, J., Ogurtsov, P., Peck-Radosavljevic, M., Shiffman, M.L., Yurdaydin, C. & Dalgard, O., 2011. Management of adverse effects of Peg-IFN and ribavirin therapy for hepatitis C. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 8(4), S.212–223.
- Summers, J., O'Connell, A. & Millman, I., 1975. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(11), S.4597–4601.
- Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M.L., Bassendine, M., Spengler, U., Dore, G.J., Powell, E., Riordan, S., Sheridan, D., Smedile, A., Fragomeli, V., Müller, T., Bahlo, M., Stewart, G.J., Booth, D.R. & George, J., 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nature genetics*, 41(10), S.1100–1104.
- Szabo, A. & Rajnavolgyi, E., 2013. Collaboration of Toll-like and RIG-I-like receptors in human dendritic cells: tRIGgering antiviral innate immune responses. *American journal of clinical and experimental immunology*, 2(3), S.195–207.
- Szmunes, W., Stevens, C.E., Zang, E.A., Harley, E.J. & Kellner, A., 1981. A controlled clinical trial of the efficacy of the hepatitis B vaccine (Heptavax B): a final report. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1(5), S.377–385.
- Takeuchi, O. & Akira, S., 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunological reviews*, 227(1), S.75–86.
- Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., Kurosaki, M., Matsuura, K., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Korenaga, M., Hino, K., Hige, S., Ito, Y., Mita, E., Tanaka, E., Mochida, S., Murawaki, Y., Honda, M., Sakai, A., Hiasa, Y., Nishiguchi, S., Koike, A., Sakaida, I., Imamura, M., Ito, K., Yano, K., Masaki, N., Sugauchi, F., Izumi, N., Tokunaga, K. & Mizokami, M., 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature genetics*, 41(10), S.1105–1109.
- Tardif, K.D., Mori, K. & Siddiqui, A., 2002. Hepatitis C Virus Subgenomic Replicons Induce Endoplasmic Reticulum Stress Activating an Intracellular Signaling Pathway. *Journal of Virology*, 76(15), S.7453–7459.
- Thomas, D.L., Thio, C.L., Martin, M.P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S.I., Alexander, G., Goedert, J.J., Kirk, G.D., Donfield, S.M., Rosen, H.R., Tobler, L.H., Busch, M.P., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B. & Carrington, M., 2009.

- Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 461(7265), S.798–801.
- Tsan, Y.-T., Lee, C.-H., Wang, J.-D. & Chen, P.-C., 2012. Statins and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(6), S.623–630.
- Tuschl, T. & Borkhardt, A., 2002. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Molecular interventions*, 2(3), S.158–167.
- Uematsu, S. & Akira, S., 2008. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handbook of experimental pharmacology*, (183), S.1–20.
- Urban, T.J., Thompson, A.J., Bradrick, S.S., Fellay, J., Schuppan, D., Cronin, K.D., Hong, L., McKenzie, A., Patel, K., Shianna, K.V., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B. & Afdhal, N., 2010. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 52(6), S.1888–1896.
- Uzé, G. & Monneron, D., 2007. IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. *Biochimie*, 89(6–7), S.729–734.
- Vanden Bush, T.J. & Bishop, G.A., 2008. TLR7 and CD40 cooperate in IL-6 production via enhanced JNK and AP-1 activation. *European journal of immunology*, 38(2), S.400–409.
- Vincent, I.E., Zannetti, C., Lucifora, J., Norder, H., Protzer, U., Hainaut, P., Zoulim, F., Tommasino, M., Trépo, C., Hasan, U. & Chemin, I., 2011. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PloS one*, 6(10), S.e26315.
- Walters, K.-A., Joyce, M.A., Thompson, J.C., Smith, M.W., Yeh, M.M., Prohl, S., Zhu, L.-F., Gao, T.J., Kneteman, N.M., Tyrrell, D.L. & Katze, M.G., 2006. Host-specific response to HCV infection in the chimeric SCID-beige/Alb-uPA mouse model: role of the innate antiviral immune response. *PLoS pathogens*, 2(6), S.e59.
- Wang, H. & Ryu, W.-S., 2010. Hepatitis B virus polymerase blocks pattern recognition receptor signaling via interaction with DDX3: implications for immune evasion. *PLoS pathogens*, 6(7), S.e1000986.
- Wang, L., Jeng, K.-S. & Lai, M.M.C., 2011. Poly(C)-binding protein 2 interacts with sequences required for viral replication in the hepatitis C virus (HCV) 5' untranslated region and directs HCV RNA replication through circularizing the viral genome. *Journal of virology*, 85(16), S.7954–7964.
- Wei, C., Ni, C., Song, T., Liu, Y., Yang, X., Zheng, Z., Jia, Y., Yuan, Y., Guan, K., Xu, Y., Cheng, X., Zhang, Y., Yang, X., Wang, Y., Wen, C., Wu, Q., Shi, W. & Zhong, H., 2010. The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(2), S.1158–1168.
- Weng, H.-L., Wang, B.-E., Jia, J.-D., Wu, W.-F., Xian, J.-Z., Mertens, P.R., Cai, W.-M. & Dooley, S., 2005. Effect of Interferon-Gamma on Hepatic Fibrosis in Chronic Hepatitis B Virus Infection: A Randomized Controlled Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3(8), S.819–828.

- Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R.H. & Chisari, F.V., 2004. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), S.6669–6674.
- Wollersheim, M., Debelka, U. & Hofschneider, P.H., 1988. A transactivating function encoded in the hepatitis B virus X gene is conserved in the integrated state. *Oncogene*, 3(5), S.545–552.
- Woltman, A.M., Op den Brouw, M.L., Biesta, P.J., Shi, C.C. & Janssen, H.L.A., 2011. Hepatitis B Virus Lacks Immune Activating Capacity, but Actively Inhibits Plasmacytoid Dendritic Cell Function. *PLoS ONE*, 6(1), S.e15324.
- Wooddell, C.I., Rozema, D.B., Hossbach, M., John, M., Hamilton, H.L., Chu, Q., Hegge, J.O., Klein, J.J., Wakefield, D.H., Oropeza, C.E., Deckert, J., Roehl, I., Jahn-Hofmann, K., Hadwiger, P., Vornlocher, H.-P., McLachlan, A. & Lewis, D.L., 2013. Hepatocyte-targeted RNAi Therapeutics for the Treatment of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Molecular Therapy*, 21(5), S.973–985.
- Wu, J., Lu, M., Meng, Z., Trippler, M., Broering, R., Szczeponek, A., Krux, F., Dittmer, U., Roggendorf, M., Gerken, G. & Schlaak, J.F., 2007. Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(6), S.1769–1778.
- Wu, J., Meng, Z., Jiang, M., Pei, R., Trippler, M., Broering, R., Bucchi, A., Sowa, J.-P., Dittmer, U., Yang, D., Roggendorf, M., Gerken, G., Lu, M. & Schlaak, J.F., 2009. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(4), S.1132–1140.
- Wu, J., Meng, Z., Jiang, M., Zhang, E., Trippler, M., Broering, R., Bucchi, A., Krux, F., Dittmer, U., Yang, D., Roggendorf, M., Gerken, G., Lu, M. & Schlaak, J.F., 2010. Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology*, 129(3), S.363–374.
- Wu, M., Xu, Y., Lin, S., Zhang, X., Xiang, L. & Yuan, Z., 2007. Hepatitis B virus polymerase inhibits the interferon-inducible MyD88 promoter by blocking nuclear translocation of Stat1. *Journal of General Virology*, 88(12), S.3260–3269.
- Xia, C., Lu, M., Zhang, Z., Meng, Z., Zhang, Z. & Shi, C., 2008. TLRs antiviral effect on hepatitis B virus in HepG2 cells. *Journal of applied microbiology*, 105(5), S.1720–1727.
- Xiao, C., Qin, B., Chen, L., Liu, H., Zhu, Y. & Lu, X., 2012. Preactivation of the interferon signalling in liver is correlated with nonresponse to interferon alpha therapy in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Journal of Viral Hepatitis*, 19(2), S.e1–e10.
- Xiao, X. & Song, B.-L., 2013. SREBP: a novel therapeutic target. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 45(1), S.2–10.
- Xie, Q., Shen, H.-C., Jia, N.-N., Wang, H., Lin, L.-Y., An, B.-Y., Gui, H.-L., Guo, S.-M., Cai, W., Yu, H., Guo, Q. & Bao, S., 2009. Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 11(4), S.515–523.

- Xing, X.-K., Li, S.-J., He, J.-L. & Chen, Z., 2012. Inhibition of hepatitis C virus replication by single and dual small interfering RNA using an HCV-infected cell model. *Biotechnology letters*, 34(2), S.295–301.
- Xu, Y., Hu, Y., Shi, B., Zhang, X., Wang, J., Zhang, Z., Shen, F., Zhang, Q., Sun, S. & Yuan, Z., 2009. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells. *Molecular immunology*, 46(13), S.2640–2646.
- Yao, L., Yan, X., Dong, H., Nelson, D.R., Liu, C. & Li, X., 2011. Expression of an IRF-3 fusion protein and mouse estrogen receptor, inhibits hepatitis C viral replication in RIG-I-deficient Huh 7.5 cells. *Virology journal*, 8, S.445.
- Ye, J., Wang, C., Sumpter, R., Jr, Brown, M.S., Goldstein, J.L. & Gale, M., Jr, 2003. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), S.15865–15870.
- Yoshizato, K., Tateno, C. & Utoh, R., 2012. Mice with liver composed of human hepatocytes as an animal model for drug testing. *Current drug discovery technologies*, 9(1), S.63–76.
- You, Q., Cheng, L., Kedl, R.M. & Ju, C., 2008. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology*, 48(3), S.978–990.
- Yu, S., Chen, J., Wu, M., Chen, H., Kato, N. & Yuan, Z., 2010. Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3. *The Journal of general virology*, 91(Pt 8), S.2080–2090.
- Zamanian-Daryoush, M., Marques, J.T., Gantier, M.P., Behlke, M.A., John, M., Rayman, P., Finke, J. & Williams, B.R.G., 2008. Determinants of cytokine induction by small interfering RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 28(4), S.221–233.
- Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J.M., Gygi, S. & Krug, R.M., 2005. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29), S.10200–10205.
- Zhu, Q., Guo, J.-T. & Seeger, C., 2003. Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *Journal of virology*, 77(17), S.9204–9210.
- Zhu, Y., Qin, B., Xiao, C., Lu, X. & Chen, L., 2012. Cell-type specific interferon stimulated gene staining in liver underlies response to interferon therapy in chronic HBV infected patients. *Digestive diseases and sciences*, 57(9), S.2355–2361.
- Zimmermann, T.S., Lee, A.C.H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M.N., Harborth, J., Heyes, J.A., Jeffs, L.B., John, M., Judge, A.D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L.V., Palmer, L.R., Racie, T., Röhl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., Sood, V., Soutschek, J., Toudjarska, I., Wheat, A.J., Yaworski, E., Zedalis, W., Koteliensky, V., Manoharan, M., Vornlocher, H.-P. & MacLachlan, I., 2006. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441(7089), S.111–114.

## 7 Anhang

### 7.1 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerken, dem ärztlichen Direktor der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie für die Bereitstellung seiner wissenschaftlichen Laboratorien und seinem finanziellen Beitrag zu dieser Arbeit bedanken. Ein ganz besonders großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Schlaak für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Durch seine Ideen hat er diese Arbeit maßgeblich geprägt. Dank seiner Anregungen konnte ich eigene wissenschaftliche Ideen entwickeln und verwirklichen. Herr Prof. Dr. Schlaak hat die zahlreichen Kongressbeiträge, die im Rahmen dieser Arbeit zustande gekommen sind, immer unterstützt und mir damit die Möglichkeiten eröffnet, meine Daten international vorzustellen und zu diskutieren. Ein weiterer inniger Dank geht an Frau Dr. Ruth Bröring. Sie hat mein wissenschaftliches Handeln mit großer Kompetenz betreut und meine Hirnwindungen wieder entknotet, wann immer dies notwendig war. Für die Zeit und Mühe, die sie u.a. in meine literarischen Werke investiert hat, bin ich Ihr unendlich dankbar. Ein großer Dank geht an alle Kooperationspartner, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Der Roche Kulmbach GmbH für die Bereitstellung der siRNAs, insbesondere Herrn Dr. Matthias J. John für sein umfangreiches Wissen zum Thema siRNA.
- Herrn Prof. Dr. Ulf Dittmer und Frau Dr. Kathrin Gibbert (Institut für Virologie, UK Essen) für die Bereitstellung der TLR3<sup>-/-</sup> Mäuse.
- Herrn Prof. H. Baba und Frau Dorothe Möllmann (Institut für Pathologie, UK Essen) für die Anfertigungen der Gewebeschnitte und der HE Färbungen.
- Herrn Prof. Dr. Mengji Lu und Frau Thekla Kemper (Institut für Virologie, UK Essen) für die Beratung und Unterstützung im HBV-Projekt.
- Herrn Prof. Dr. Reinhold Schirmbeck und Frau Dr. Petra Riedl (Zentrum für Innere Medizin, Uniklinikum Ulm) für die Bereitstellung des HBcAg-Antikörpers.
- Der Arbeitsgruppe von Frau Jun.-Prof. Dr. Babara Sitek (Medizinisches Proteom-Center, Ruhr-Universität Bochum) für die Durchführung der Proteomanalysen.

- Dem Leiter des Zentralen Tierlabors Herrn Prof. Dr. Gero Hilken und seinem Team, insbesondere seien hier Anna, Saskia und Maike erwähnt.

Für die technische Unterstützung danke ich Frau Kathrin Kleinehr und Frau Sabrina Driftmann, die mir viel Arbeit abgenommen haben. Dem gesamten Team der „Gastro“ danke ich für die gute Zusammenarbeit: Frau Dr. Svenja Sydor, Herr Dr. Martin Trippler, Frau Dr. Carolina Hoyo-Becerra, Frau Melanie Lutterbeck, Frau Lena Poggenpohl, Frau Anastasia Hübener, Frau Olessja Pankraz, Herr Martin Schlattjan, Herr Dr. Jan-Peter Sowa, Herr Dr. Thomas Schreiter, Frau Lena Wingerter, Frau Anja Beilfuß, Frau M. Beste, Frau Anne Achterfeld, Frau Katja Piras-Straub, Frau Khaleda Khairzada, Frau Prof. Dr. Elke Cario, Frau Dr. Annette Eyking, Frau Dr. Birgit Ey, Frau Federike Bartsch, Frau Magdalena Klepak.

Der letzte Dank geht an meine Familie und Freunde für ihre Unterstützung. Marcel danke ich dafür, dass er es immer noch mit mir aushält... in diesem Sinn

**Alles wird gut!!!**

## 7.2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

### Artikel

1. Real C.I., Lu, M., Hossbach, M., Deckert, J., Jahn-Hofmann, K., Ickenstein, L.M., John, M.J., Gibbert, K., Kemper, T., Kleinehr, K., Driftmann, S., Vornlocher, H.P., Schirmbeck, R., Gerken, G., Dittmer, U., Schlaak, J.F., Broering, R., **2014**. Hepadnaviral replication in HBV-transgenic mice lacking the HBsAg is accompanied by toll-like receptor 3-mediated interferon responses. *in preparation*
2. Broering, R., Trippler, M., Lutterbeck, M., Real, C.I., Megger, D.A., Bracht, T., Schweinsberg, V., Sitek, B., Eisenacher, M., Meyer, H.E., Baba, H.A., Weber, F., Hoffmann, A.C., Gerken, G., Schlaak, J.F., **2014**. Proteasome subunit alpha type-6 regulates the expression of proviral host genes in hepatitis C virus infection. *in submission*
3. Kallenborn-Gerhardt, W., Lu, R., Bothe, A., Thomas, D., Schlaudraff, J., Lorenz, J.E., Lippold, N., Real, C.I., Ferreirós, N., Geisslinger, G., Del Turco, D., Schmidtke, A., **2014**. Phosphodiesterase 2A localized in the spinal cord contributes to inflammatory pain processing. **Anesthesiology**, 121(2):372-82
4. Real, C.I., Megger, D.A., Sitek, B., Jahn-Hofmann, K., Ickenstein, L.M., John, M.J., Walker, A., Timm, J., Kuhlmann, K., Eisenacher, M., Meyer, H.E., Gerken, G., Broering, R. & Schlaak, J.F., **2013**. Identification of proteins that mediate the pro-viral functions of the interferon stimulated gene 15 in hepatitis C virus replication. **Antiviral Research**, 100(3), S.654–661.
5. Broering, R.\* , Real, C.I.\*, John, M.J., Jahn-Hofmann, K., Ickenstein, L.M., Kleinehr, K., Paul, A., Gibbert, K., Dittmer, U., Gerken, G. & Schlaak, J.F., **2013**. Chemical modifications on siRNAs avoid Toll-like-receptor-mediated activation of the hepatic immune system *in vivo* and *in vitro*. **International immunology**. 26(1):35-46.      \* Gleichberechtigte Erstautoren
6. Troeschel, S.C., Thies, S., Link, O., Real, C.I., Knops, K., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.E., **2012**. Novel broad host range shuttle vectors for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*. **Journal of Biotechnology**, 161(2):71-9.

**Auszeichnungen****Promotionspreis:**

Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vivo* knockdown, mediated by LNP01-formulated siRNAs, of HCV pro-viral factor ISG15 increased responsiveness to Interferon. **DGVS Hamburg, 2012**

**Posterpreis Nominierung:**

Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. siRNA-mediated suppression of ISG15 leads to enhanced responsiveness to interferon *in vivo*. **22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society for Virology, Essen, 2012**

**Posterpreis:**

Real, C.I.; Broering, R.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. The chemical ribose modifications of siRNA backbone minimize the non-specific activation of liver cells by therapeutically applied siRNAs. **Der Gastroenterologe** Volume 6, Issue 2, March **2011**



## Vorträge

### 69. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2014 (Leipzig)

1. Real C.I.\*; Lu, M.; Hossbach, M.; Deckert, J.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.M.; John, M.J.; Gibbert, K.; Kemper, T.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Vornlocher, H.P.; Schirmbeck, R.; Gerken, G.; Dittmer, U.; Schlaak, J.F.; Broering, R., **2014**. Hepadnaviral replication in HBV-transgenic mice lacking the surface antigen (HBsAg) is controlled by toll-like receptor 3-induced immune responses.

### 23. Tagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Nordrhein-Westfalen e.V. 2014 (Neuss)

2. Real, C.I.\*; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Kemper, T.; Vornlocher, H.P.; Schirmbeck, R.; Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Die Hepatitis-B-Virus Replikation in transgenen, HBs-defizienten, Mäusen induziert eine Toll-like Rezeptor 3 Antwort.

### 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2012 (Hamburg)

3. Real, C.I.\*; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vivo* knockdown, mediated by LNP01-formulated siRNAs, of HCV pro-viral factor ISG15 increased responsiveness to Interferon.
4. Real, C.I.\*; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Hepatic, MyD88-dependent toll-like receptors are activated by *in vivo* application of LNP01-formulated siRNAs.
5. Wang, B.; Broering, R.\*; Real, C.I., Trippler, M.; Gerken, G.; Lu, L.; Schlaak J.F. Innate immune system modulated the expression of RANTES and the function of activated primary hepatic stellate cells.
6. Huebener, A.; Hoyo-Becerra, C.\*; Real, C.I.; Trippler, M.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Interferon-alpha treatment differentially modifies the expression of depression-related interferon-inducible genes *in vivo* and *in vitro*.

### EASL-AASLD Special Conference on Therapy of Hepatitis C: Clinical application and drug development 2012 (Prag)

7. Real, C.I.\*; Broering, R.; Megger, D.A.; Sitek, B.; Meyer, H.E.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Functional analysis of the pro-viral host factor ISG15 and its role in HCV replication.

**Keystone Symposia Nucleic Acid Therapeutics: From Base Pairs to Bedsides 2012 (Santa Fe, USA)**

8. Real, C.I.; Broering, R.\*; John, M.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vivo* application of LNP01-formulated siRNAs activates the hepatic immune system which can be controlled by chemical ribose modifications.
9. Real, C.I.; Broering, R.\*; John, M.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Suppression of ISG15 in hepatocytes, mediated by LNP01-formulated siRNAs, leads to enhanced responsiveness to interferon *in vivo*.

**18<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and related Viruses 2011 (Seattle, USA)**

10. Real, C.I.; Broering, R.\*; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vivo* suppression of interferon sensitive gene 15 (ISG15), a pro-viral host factor in HCV replication, enhances the responsiveness to endogenous interferon.

**American association for study of liver diseases (AASLD) 2010 (Boston, USA)**

11. Broering, R.\*; Real, C.I.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. The non-specific activation of hepatocytes and non-parenchymal liver cells by siRNAs can be controlled by chemical ribose modifications and may involve endosomal Toll-like receptors.

\*markiert den Referenten

**Poster und Abstracts**

1. Real C.I.; Lu, M.; Hossbach, M.; Deckert, J.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.M.; John, M.J.; Gibbert, K.; Kemper, T.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Vornlocher, H.P.; Schirmbeck, R.; Gerken, G.; Dittmer, U.; Schlaak, J.F.; Broering, R. Toll-like receptor 3-activated non-parenchymal liver cells control hepadnaviral replication in HBV-transgenic mice lacking the surface antigen (HBsAg). ***Hepatology* in press 2014** (AASLD 2014)
2. Lutterbeck, M.; Real, C.I.; Skibbe, K.; Timm, J.; Paul, A.; Gerken, G.; Schlaak, J.F.; Broering, R. All-in-one liver cell preparation: high quality of functional primary human hepatocytes, liver sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells and hepatic stellate cells. ***Hepatology* in press 2014** (AASLD 2014)
3. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Kemper, T.; Vornlocher, H.P.; Schirmbeck, R.; Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Hepadnaviral replication in HBV-transgenic mice lacking the surface antigen is accompanied by toll-like receptor 3 mediated interferon responses. ***Journal of Hepatology* vol. 60 April, Issue 1, 2014.** p. S116 (EASL 2014)

4. Broering,R.; Trippler, M.; Lutterbeck, M.; Real, C.I.; Kleinehr, K.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Interferon stimulated gene 15, a pro-viral factor for hepatitis C virus, and proteasome subunit alpha type-6 are induced by Poly(I:C) and reciprocally affect each other. **Journal of Hepatology** vol. 60 April, Issue 1, **2014**. p. S115 (EASL 2014)
5. Real, C.I.; Broering,R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Kemper, T.; Vornlocher, H.P.; Schirmbeck, R., Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. In HBV-transgenic mice lacking the HBsAg, the viral replication is accompanied by constitutively induced interferon responses, mediated by Toll-like receptor 3 activation. **Der Gastroenterologe** Volume 9, Issue 2, March **2014**
6. Broering,R.; Trippler, M.; Real, C.I.; Lutterbeck, M.; Kleinehr, K.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Proteasome subunit alpha type-6 seems to be an innate player in viral hepatitis. **Der Gastroenterologe** Volume 9, Issue 2, March **2014**
7. Real, C.I.; Broering,R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Kemper, T.; Vornlocher, H.P.; Schirmbeck, R., Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Toll-like receptor 3 activation mediates the expression of interferon and interferon stimulated genes during hepadnaviral replication in HBV-transgenic mice lacking the HBs-antigen. **Zeitschrift für Gastroenterologie** **2014**; 52-P5\_50 (30. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber)
8. Broering,R.; Trippler, M.; Real, C.I.; Lutterbeck, M.; Kleinehr, K.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Interferon stimulated gene 15, a proviral factor in hepatitis C virus replication, is regulated by the Proteasome subunit alpha type-6. **Zeitschrift für Gastroenterologie** **2014**; 52-P5\_26 (30. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber)
9. Real, C.I.; Broering,R.; Trippler, M.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Kemper, T.; Vornlocher, H.P.; Schirmbeck, R., Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Interferon and interferon stimulated genes are up-regulated during viral replication in HBV-transgenic mice lacking the HBs-antigen. 459. **Hepatology** Volume 58, Issue S1, October **2013** (AASLD 2013)
10. Real, C.I.; Broering,R.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Schirmbeck, R., Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Hepatic toll-like receptor 3, -7 and -9 activation is not impaired in HBV-transgenic mice lacking the HBs-antigen.456. **Hepatology** Volume 58, Issue S1, October **2013** (AASLD 2013)
11. Broering,R.; Trippler, M.; Real, C.I.; Lutterbeck, M.; Kleinehr, K.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Proteasome subunit alpha type-6 has been identified as a regulator of the interferon stimulated gene 15, a pro-viral factor in hepatitis C virus replication.2002. **Hepatology** Volume 58, Issue S1, October **2013** (AASLD 2013)

- 
12. Real, C.I.; Broering,R.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Schirmbeck, R., Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Hepatic toll-like receptor 3, -7 and -9 activation is not impaired in HBV-transgenic mice lacking the HBs-antigen. **International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Shanghai **2013**
  13. Real, C.I.; Broering,R.; Trippler, M.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Kemper, T.; Vornlocher, H.P.; Schirmbeck, R., Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Interferon and interferon stimulated genes are up-regulated during viral replication in HBV-transgenic mice lacking the HBs-antigen. **International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Shanghai **2013**
  14. Real, C.I.; Broering,R.; Trippler, M.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Kemper, T.; Vornlocher, H.P.; Schirmbeck, R., Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. The interferon response is significantly induced by hepatitis B virus replication in HBV-transgenic mice lacking the HBsAg. **Hepatology International** Volume 7, Issue 1 Supplement, June **2013** (APASL 2013)
  15. Real, C.I.; Broering,R.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Schirmbeck, R., Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Toll-like receptor-mediated immune responses are not impaired HBV-transgenic mice lacking HBsAg. **Hepatology International** Volume 7, Issue 1 Supplement, June **2013** (APASL 2013)
  16. Real, C.I.; Broering, R.; Trippler, M.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Kemper, T.; Vornlocher, H.P.; Schirmbeck, R.; Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Viral replication in HBV-transgenic mice lacking the HBsAg significantly induces interferon responses. **Journal of Hepatology** vol. 58 April, **2013**. p. S163 (EASL 2013)
  17. Real, C.I.; Broering, R.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Schirmbeck, R.; Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. The pro-inflammatory response induced by Toll-like receptor activation *in vivo* is not impaired in the liver of HBV-transgenic mice lacking HBsAg. **Journal of Hepatology** vol. 58 April, **2013**. p. S163 (EASL 2013)
  18. Real, C.I.; Broering, R.; Trippler, M.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Kemper, T.; Vornlocher, H.P.; Schirmbeck, R.; Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Viral replication induces significant interferon responses in HBV-transgenic mice lacking the HBsAg. **Der Gastroenterologe** Volume 8, Issue 2, March **2013**
  19. Real, C.I.; Broering, R.; Megger, D.A.; Sitek, B.; Meyer, H. E.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vitro* and *in vivo* identification of target proteins that mediate the pro-viral functions of the interferon sensitive gene 15 in hepatitis C virus replication. **Der Gastroenterologe** Volume 8, Issue 2, March **2013**
  20. Real, C.I.; Broering, R.; Trippler, M.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Kemper, T.; Vornlocher, H.P.; Reimann, J.; Schirmbeck, R.; Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. HBV-transgenic mice lacking HBsAg exhibit an up-regulation of IFNs and ISGs. **23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Virology**, Kiel, **2013**
-

- 
21. Real, C.I.; Broering, R.; Kleinehr, K.; Schirmbeck, R.; Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. In the liver of HBV-transgenic mice lacking HBsAg the pro-inflammatory response induced by Toll-like receptor activation is not impaired. **23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Virology**, Kiel, **2013**
22. Real, C.I.; Broering, R.; Megger, D.A.; Sitek, B.; Meyer, H. E.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vitro* and *in vivo* identification of target proteins that mediate the pro-viral functions of the interferon sensitive gene 15 in hepatitis C virus replication. **23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Virology**, Kiel, **2013**
23. Real, C.I.; Broering, R.; Trippler, M.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Driftmann, S.; Kemper, T.; Vornlocher, H.P.; Reimann, J.; Schirmbeck, R.; Lu, M.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. IFNs and ISGs are up-regulated in HBV-transgenic mice lacking HBsAg. **Zeitschrift für Gastroenterologie** **2013**; 51-P5\_56 (29. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber)
24. Real, C.I.; Broering, R.; Megger, D.A.; Sitek, B.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Suppression of the interferon sensitive gene 15 affects the expression of proteins that play a role in HCV replication. **Zeitschrift für Gastroenterologie** **2013**; 51-P5\_55 (29. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber)
25. Wang, B.; Broering, R.; Real, C.I.; Lutterbeck, M.; Gerken, G.; Lu, L.; Schlaak J.F. Activation by Pathogen- and Damage-Associated Molecular Patterns Regulates the Expression of RANTES in Primary Hepatic Stellate Cells. **Zeitschrift für Gastroenterologie** **2013**; 51-P1\_52 (29. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber)
26. Real, C.I.; Broering, R.; Megger, D.A.; Pankraz, O.; Sitek, B.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Functional analysis of the HCV pro-viral factor ISG15 *in vitro* and *in vivo*. **Hepatology** Volume 56, Issue S1, October **2012** (AASLD 2012)
27. Wang, B.; Broering, R.; Real, C.I.; Trippler, M.; Gerken, G.; Lu, L.; Schlaak J.F. Activation by pathogen- and damage-associated molecular patterns regulates the expression of RANTES in primary hepatic stellate cells. **Hepatology** Volume 56, Issue S1, October **2012** (AASLD 2012)
28. Huebener, A.; Hoyo-Becerra, C.; Real, C. I.; Trippler, M.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J. F. Interferon-alpha treatment induces the expression of depression-related genes *in vivo* and *in vitro*. **Hepatology** Volume 56, Issue S1, October **2012** (AASLD 2012)
29. Real, C.I.; Broering, R.; Megger, D.A.; Sitek, B.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Role of the pro-viral host factor ISG15 in pathways regulating HCV replication. **19<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and related Viruses**, Venedig, **2012**
-

30. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vivo* knockdown, mediated by LNP01-formulated siRNAs, of HCV pro-viral factor ISG15 increased responsiveness to Interferon. **Zeitschrift für Gastroenterologie** **2012**; Ausgabe 08, Vol. 50 (67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten)
31. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Hepatic, MyD88-dependent toll-like receptors are activated by *in vivo* application of LNP01-formulated siRNAs. **Zeitschrift für Gastroenterologie** **2012**; Ausgabe 08, Vol. 50 (67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten)
32. Wang, B.; Broering, R.; Real, C.I.; Trippler, M.; Gerken, G.; Lu, L.; Schlaak J.F. Innate immune system modulated the expression of RANTES and the function of activated primary hepatic stellate cells. **Zeitschrift für Gastroenterologie** **2012**; Ausgabe 08, Vol. 50 (67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten)
33. Huebener, A.; Hoyo-Becerra, C.; Real, C.I.; Trippler, M.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Interferon-alpha treatment differentially modifies the expression of depression-related interferon-inducible genes *in vivo* and *in vitro*. **Zeitschrift für Gastroenterologie** **2012**; Ausgabe 08, Vol. 50 (67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten)
34. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. The interferon response *in vivo* is increased by selective ISG15 knockdown in hepatocytes through LNP-formulated siRNAs. **International symposium on viral hepatitis and liver disease**, Shanghai, **2012** (ISVHLD 2012)
35. Huebener, A.; Hoyo-Becerra, C.; Real, C. I.; Trippler, M.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J. F. Consensus-interferon-alpha treatment differentially modifies the expression of depression-related interferon-inducible genes *in vivo* and *in vitro*. **International symposium on viral hepatitis and liver disease**, Shanghai, **2012** (ISVHLD 2012)
36. Wang, B.; Broering, R.; Real, C.I.; Trippler, M.; Gerken, G.; Lu, L.; Schlaak J.F. The innate immune system modulates the expression of RANTES and the function of activated primary hepatic stellate cells. **International symposium on viral hepatitis and liver disease**, Shanghai, **2012** (ISVHLD 2012)
37. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. ISG15 suppression in hepatocytes, mediated by LNP01-formulated siRNAs, leads to enhanced responsiveness to interferon *in vivo*. **Journal of Hepatology** vol. 56 April, **2012**. p. S315 (EASL 2012)

- 
38. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Application of LNP01-formulated siRNAs *in vivo* activates hepatic toll-like receptors via MyD88-dependent pathways which can be controlled by chemical ribose modifications. **Journal of Hepatology** vol. 56 April, **2012**. p. S315 (EASL 2012)
39. Wang, B.; Broering, R.; Real, C.I.; Trippler, M.; Gerken, G.; Lu, L.; Schlaak J.F. TLR3 induced expression of RANTES modulates the function of activated primary hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology** vol. 56 April, **2012**. p. S162 (EASL 2012)
40. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vivo* application of LNP01-formulated siRNAs activates hepatic, MyD88-dependent toll-like receptors which can be repressed by chemical ribose modifications. **Der Gastroenterologe** Volume 7, Issue 2, March **2012**
41. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Responsiveness to interferon *in vivo* is increased by ISG15 knockdown in hepatocytes, mediated by LNP01-formulated siRNAs. **Der Gastroenterologe** Volume 7, Issue 2, March **2012**
42. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. siRNA-mediated suppression of ISG15 leads to enhanced responsiveness to interferon *in vivo*. **22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society for Virology**, Essen, **2012**
43. Real, C.I.; Broering, R.; John, M.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vivo* treatment with nanolipid-formulated siRNAs targeting ISG15 leads to enhanced responsiveness to interferon in primary hepatocytes **Zeitschrift für Gastroenterologie 2012**; 50-P4\_42 (28. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber)
44. Real, C.I.; Broering, R.; John, M.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Hepatic toll-like receptors can be activated by application of siRNAs *in vivo* via MyD88-dependent pathways which can be controlled by chemical ribose modifications of the siRNA backbone. **Zeitschrift für Gastroenterologie 2012**; 50-P4\_43 (28. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber)
45. Wang, B.; Broering, R.; Real, C.I.; Trippler, M.; Gerken, G.; Lu, L.; Schlaak J.F. HCV/TLR3 modulated the expression of RANTES in murine activated hepatic stellate cells. **Zeitschrift für Gastroenterologie 2012**; 50-P4\_56 (28. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber)
46. Real, C.I.; Broering, R.; John, M.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vivo* application of LNP01-formulated siRNAs activates the hepatic immune system which can be controlled by chemical ribose modifications. **Keystone Symposia Nucleic Acid Therapeutics: From Base Pairs to Bedsides (A2)**, Santa Fe, USA, **2012**
-

- 
47. Real, C.I.; Broering, R.; John, M.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Suppression of ISG15 in hepatocytes, mediated by LNP01-formulated siRNAs, leads to enhanced responsiveness to interferon *in vivo*. **Keystone Symposia Nucleic Acid Therapeutics: From Base Pairs to Bedsides (A2)**, Santa Fe, USA, **2012**
48. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. siRNA-induced suppression of ISG15 *in vivo* leads to enhanced responsiveness to endogenous interferon in hepatocytes. **Hepatology** Volume 54, Issue S1, October **2011** (AASLD 2011)
49. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. Activation of the hepatic immune system by application of siRNAs *in vivo* can be controlled by chemical ribose modifications of the siRNA backbone. **Hepatology** Volume 54, Issue S1, October **2011** (AASLD 2011)
50. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vivo* suppression of interferon sensitive gene 15 (ISG15), a pro-viral host factor in HCV replication, enhances the responsiveness to endogenous interferon. **18<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and related Viruses**, Seattle, USA, **2011**
51. Real, C.I.; Broering, R.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. *In vivo* treatment with nanolipid-formulated siRNAs targeting ISG15 leads to enhanced TLR-induced expression of interferon-sensitive genes in hepatocytes. DDW Abstract Supplement to **Gastroenterology**, Volume 140, Issue 5, Supplement 1, **2011**
52. Real, C.I.; Broering, R.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. The non-specific activation of liver cells by therapeutically applied siRNAs is minimized by chemical ribose modifications of the siRNA backbone. **Journal of Hepatology** vol. 54 March, **2011**. p. S124 (EASL 2011)
53. Real, C.I.; Broering, R.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. The chemical ribose modifications of siRNA backbone minimize the non-specific activation of liver cells by therapeutically applied siRNAs. **Der Gastroenterologe** Volume 6, Issue 2, March **2011**
54. Broering, R.; Real, C.I.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. The non-specific activation of liver tissue by siRNAs *in vivo* can be controlled by chemical ribose modifications of siRNAs. **Zeitschrift für Gastroenterologie** **2011**; 49-P4\_06 (27. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber)
55. Real, C.I.; Broering, R.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. The non-specific activation of liver tissue by siRNAs *in vivo* can be controlled by modification of siRNA. Forschungstag der medizinischen Fakultät des Uniklinikums Essen, **2010**
-



56. Broering, R.; Real, C.I.; Jahn-Hofmann, K.; Ickenstein, L.; John, M.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. The non-specific activation of hepatocytes and non-parenchymal liver cells by siRNAs can be controlled by chemical ribose modifications and may involve endosomal Toll-like receptors. **Hepatology** Volume 52, Issue S1, October **2010** (AASLD 2010)
57. Broering, R.; John, M.; Real, C.I.; Kleinehr, K.; Sowa, J.P.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. The immune activation of hepatocytes and non-parenchymal liver cells by siRNAs may involve endosomal Toll-like receptors and can be controlled by chemical ribose modifications. **Der Gastroenterologe** Volume 5, Issue 2, March **2010**
58. Troeschel, S.C.; Real, C.I., Wilhelm, S.; Rosenau, F. and Jaeger, K.-E. Novel shuttle vectors to construct metagenomic libraries. ProkaGenomics 2009 - **4<sup>th</sup> European Conference on Prokaryotic Genomics**. Göttingen, **2009**.
59. Troeschel, S.C.; Real, C.I.; Bertram, M.; and Jaeger, K.-E. A novel shuttle vector for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas species*. **27<sup>th</sup> Symposium - Mechanisms of Gene Regulation**. Witzenhausen, **2008**.

### **7.3 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

---

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Entwicklung siRNA basierter Therapieansätze im Mausmodell am Beispiel viraler Hepatitiden“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Catherine Isabell Real befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

Prof. Dr. med. Jörg F. Schlaak

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Catherine Isabell Real

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_

Catherine Isabell Real